

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES**

**EFFETS LETAUX ET SUBLETAUX
A LONG TERME
D'UN NONYLPHENOL POLYETHOXYLE,
LE NP 5, SUR LA CIVELLE**

Gilles BOCQUENE & Laurence MIOSSEC



DERO-87-08-MR

S O M M A I R E

I - INTRODUCTION

II - MATERIELS ET METHODES

- 1°) La civelle : organisme test
- 2°) Le NP 5
- 3°) Le flux continu d'eau de mer
- 4°) Plan expérimental
- 5°) Choix des paramètres d'observation du comportement
- 6°) Suivi histologique
- 7°) Dosage du NP 5
- 8°) Méthodes statistiques

III - RESULTATS

1°) Effets létaux du NP 5

- a) Distribution des mortalités cumulées suivant les conditions expérimentales
- b) LT 50 du NP 5

2°) Effets sublétaux du NP 5 sur le comportement

- a) Effets comateux
- b) Effets sur la nidification
- c) Animaux nageants - Animaux au repos
- d) Effet sur le rythme cardiaque
- e) Evolution des poids individuels
- f) Observations annexes

3°) Effets histologiques sur la branchie

IV - DISCUSSION

- 1°) L'effet comateux
- 2°) Influence du tube nidificateur sur l'effet toxique
- 3°) Histologie des branchies

V - CONCLUSIONS

EFFETS LETAUX ET SUBLETAUX A LONG TERMED'UN NONYLPHENOL POLYETHOXYLE, LE NP 5, SUR LA CIVELLE

Gilles BOCQUENE et Laurence MIOSSEC

I- INTRODUCTION

Dans un premier travail (MIOSSEC - BOCQUENE, 1986) nous avons déterminé la concentration létale 50 (LC 50) 48 h (*) de différents nonylphénols polyéthoxylés sur la post-larve d'anguille (Anguilla anguilla) et nous avons montré qu'ils présentent une toxicité inversement proportionnelle au nombre de molécules d'oxyéthylène qui les caractérise. Parmi les nonylphénols les plus toxiques, le NP 5 (nonylphénol à 5 molécules d'oxyéthylène) présente une LC 50 (48 h) de 1,2 mg/l. Cette étude nous a révélé plusieurs effets sublétaux tant physiologiques que comportementaux qui nécessitaient un programme d'études complémentaires, ces études portant sur les effets sublétaux à long terme du NP 5 devant nous apporter des informations indispensables à la connaissance des mécanismes d'action du toxique. Parallèlement aux observations à caractère sublétaux durant 21 jours, un suivi histologique des lamelles branchiales a été assuré tout au long de l'expérimentation ainsi que pendant une période de 13 jours supplémentaires après arrêt du polluant. Il est intéressant, en effet, dans la mesure du possible, de prolonger de plusieurs jours l'expérience en eau saine, fin de suivre d'éventuelles aggravations ou améliorations des dommages provoqués par le polluant. Ces informations aident à apprécier le caractère réversible ou irréversible des lésions observées.

D'autre part, certains problèmes rencontrés au cours de la première étude et qui concernaient la mauvaise stabilité de la concentration en toxique dans les bacs expérimentaux, nous ont contraints à modifier le dispositif expérimental et à abandonner le type de test, en statique, que nous utilisions. En effet, pour maintenir le polluant à même concentration, sur une période de 21 jours, des modifications radicales du précédent protocole expérimental s'imposaient et le seul système assumant ces contraintes étant le circuit en flux continu d'eau de mer, avec apport régulier et constant du toxique dans le milieu, nous avons donc délaissé les tests en statique (sans renouvellement ni du milieu ni du toxique) au profit d'un système, plus fiable, en flux continu.

(*) En réalité il s'agissait de 24 h de contact avec le toxique, suivies de 24 h d'observations en eau saine, la mortalité prise en compte étant relevée à 48 h.

II- MATERIELS ET METHODES

1°) La civelle : organisme test

* **Généralités** : La civelle ou piballe est la post-larve de l'anguille européenne (Anguilla anguilla). C'est un poisson disponible en grande quantité durant sa migration anadrome, lors de son arrivée sur nos côtes (novembre à avril). L'animal, selon divers facteurs (dont le mois de pêche), arrive à différents stades de développement post-larvaire et il est donc nécessaire d'opérer un tri pour assurer l'homogénéité des civelles testées. C'est pourquoi, nous n'avons donc sélectionné et utilisé que des individus du stade VI A 2 (d'après les travaux de ELIE, 1979) majoritaires au début de l'expérimentation (mars, avril). A ce stade la post-larve mesure ~ 70 mm et pèse ~ 0,25 g. De plus, elle ne se nourrit plus, la prise alimentaire recommençant seulement au stade VI A 3. LANGLE (1) signalant l'existence dans le tractus digestif de la civelle de trois systèmes de valvules s'opposant à tout transit alimentaire avant le stade VI A 3. Malgré une mélanisation avancée au stade VI A 2 la civelle conserve une grande partie de sa translucidité qui permet une observation directe de nombreux organes internes (coeur, foie, rein). Les animaux échantillonnés d'un mareyeur, sont conservés dans un aquarium de 600 l, à 12° C l'eau étant recyclée par un système de filtration permanente sur mousse de polyéther (BOCQUENE, MIOSSEC, 1985).

* **Histologie de la branchie** : Les coupes histologiques montrent une lamelle primaire dont chaque extrémité présente un vaisseau sanguin, l'un afférent, l'autre efférent. De part et d'autre de cette lamelle primaire sont disposées de nombreuses lamelles secondaires dans lesquelles circulent des hématies. A la base des lamelles secondaires on note la présence de grosses cellules à chlorure. L'épithélium branchial pluristratifié sur la lamelle primaire, est simple sur la lamelle secondaire.

2°) Le NP 5 (nonylphénol à 5 oxyéthylènes)

Les nonylphénols polyéthoxylés sont des tensio-actifs non-ioniques, émulsifiants efficaces et largement utilisés, en particulier comme dispersant lors des catastrophes pétrolières en mer. Ils sont formés d'une chaîne hydrocarbonée sur laquelle sont fixés un ou plusieurs groupements d'oxyéthylène. Selon le nombre de groupements, ces produits présentant des pouvoirs émulsionnants différents, mais aussi une toxicité inversement proportionnelle, ainsi nous avons situé la CL 50 (48 h) du NP 20 (20 molécules d'oxyéthylène) à 970 mg/l c'est-à-dire une toxicité mille fois inférieure à celle du NP 5 (5 mol. d'oxyéthylène fortement toxique : 1,2 mg/l) (MIOSSEC, BOCQUENE, 1986).

3°) Le flux continu d'eau de mer (fig. 1) (photo 1)

L'expérience de travaux précédents portant, d'une part sur les effets à long terme du pentachlorophénol sur l'épinoche (DANGER, LEMOULEC, 1984) et sur la toxicité à court terme du toluène sur la crevette Palaemonetes varians (BOCQUENE et al., 1986), d'autre part nous ont permis de réaliser un circuit de fiabilité acceptable pour assurer une étude à long terme (34 jours) en limitant les installations trop complexes susceptibles de fragiliser l'ensemble du système et entraîner l'arrêt brutal de l'expérience.

(1) Communication personnelle à R. LECOMTE-FINIGER in : Contribution à la connaissance de l'écobiologie de l'anguille des milieux lagunaires méditerranéens du golfe du Lion : Narbonnais et Roussillon. Thèse d'Etat, 1983.

Légende figure 1

- 1 - Electrovanne à niveau testeur
- 2 - Réchauffeur (utilisation éventuelle)
- 3 - Siphon
- 4 - Pompe péristaltique à micro
- 5 - Solution mère concentrée du toxique
- 6 - Circuit de distribution du toxique (en tubes téfon)
- 7 - Rampe de distribution d'eau
- 8 - Tuyau d'arrivée du toxique
- 9 - Bac d'animaux testés
- 10 - Gouttière d'évacuation des trop pleins

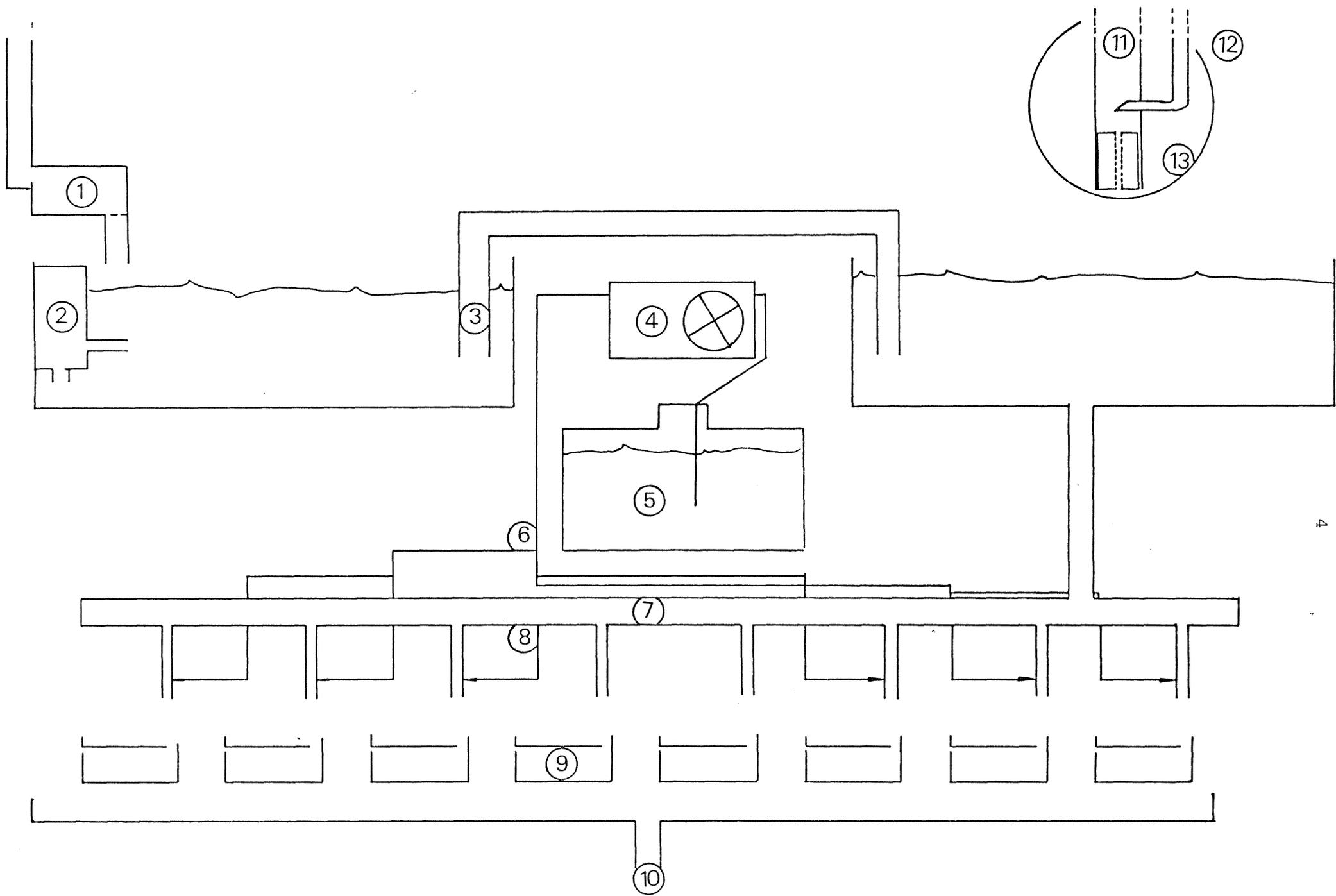


Fig. 1 - Schéma d'ensemble du circuit en flux continu d'eau de mer.

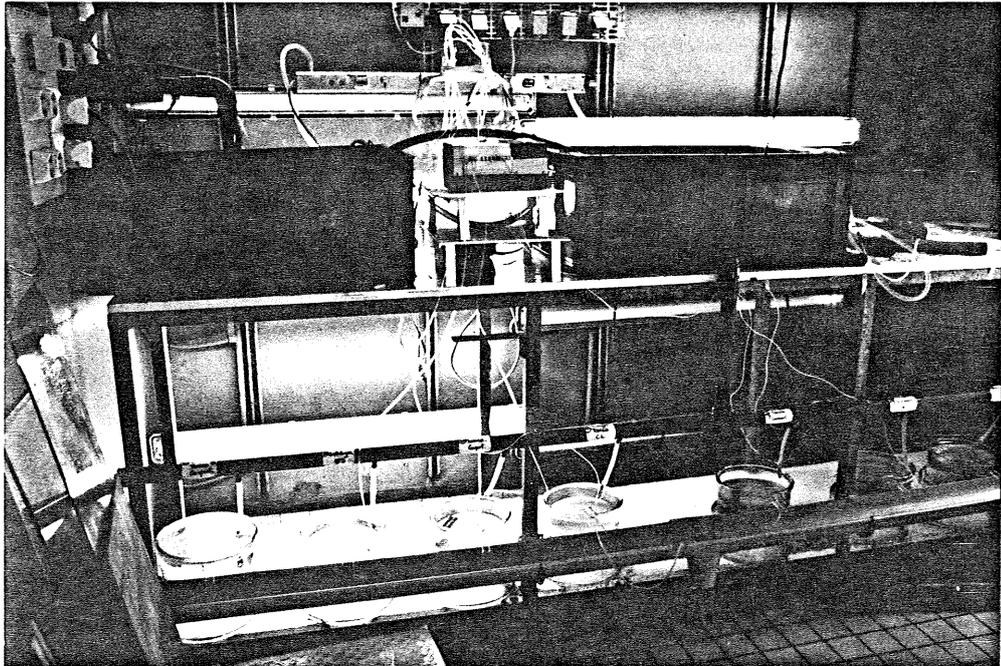


Photo 1 - Installation en flux continu d'eau de mer.

Description de l'installation

Deux citernes de stockage totalisant 30 000 litres d'eau de mer alimentent la salle d'expérimentation stabilisée à 14° C. Les grosses particules sont éliminées par décantation dans les cuves de stockage. L'eau est amenée par un circuit en PVC et parvient par gravité dans deux bacs de 160 l à partir desquels elle est répartie avec un débit rigoureusement identique dans huit cristallisoirs de deux litres. Un trop plein assure dans chaque unité l'évacuation vers une gouttière permettant ainsi un renouvellement rapide du milieu d'expérience. L'installation d'électrovannes et de sondes à niveau permet d'assurer l'équilibre de la distribution. L'arrivée du polluant se fait à partir d'une solution mère concentrée réalisée dans de l'eau de mer et la répartition pour chaque concentration est assurée à l'aide d'une pompe péristaltique ISMATEC IPN. Des tubes téflon qui amènent le toxique sont directement figés dans les tuyaux d'eau de mer en hexacanal, le mélange s'effectuant à ce niveau. Le débit horaire dans chaque cristallisoir est de deux litres ce qui entraîne un renouvellement total du milieu toutes les heures. Deux rampes ainsi réalisées sont mises en service et permettent l'utilisation de seize unités en flux continu.

4°) Plan expérimental

L'étude des effets sublétaux sur la physiologie et le comportement de la civelle exposée au NP 5 a duré 21 jours, le suivi histologique s'est prolongé au-delà pendant 13 jours. Les animaux testés ont donc été au contact du polluant durant 21 jours puis à nouveau en milieu sain pendant 13 jours. L'ensemble de l'expérimentation aura ainsi duré 34 jours.

Le premier jour, nous avons opéré un tri en sélectionnant 15 lots de 20 civelles, toutes au stade VI A 2 qui ont été ainsi réparties :

- 3 lots d'animaux témoins en eau exempte de polluant
- 3 lots d'animaux soumis à 0,2 mg/l de NP 5
- 3 lots d'animaux soumis à 0,4 mg/l de NP 5
- 3 lots d'animaux soumis à 0,6 mg/l de NP 5
- 3 lots d'animaux soumis à 0,8 mg/l de NP 5

Chaque cristallisoir est soigneusement clos à l'aide d'un film plastique pour éviter toute fuite. A compter de ce moment (J 0) et pendant 21 jours, 5 paramètres définissant un "état de comportement" sont pris en compte quotidiennement.

5°) Choix des paramètres d'observation du comportement

Ce sont essentiellement les études précédentes ayant pour animal test la civelle (plus particulièrement les effets toxiques des dispersants anti-pétrole), ainsi que l'observation de son comportement en stabulation qui nous ont guidés dans le choix de ces paramètres.

a) Mortalité

Elle peut être considérée, empiriquement, comme l'observation du comportement la moins subjective car cliniquement la plus définissable : l'animal mort ne réagit plus au stimulus mécanique, d'une pince par exemple, généralement il perd en l'espace de 2 à 3 heures sa translucidité, souvent un voile muqueux opacifie l'ensemble du corps.

La mortalité est notée chaque jour à partir de l'observation de tous les animaux.

b) Effets comateux

Le coma est un effet pathologique caractérisé par une perte de sensibilité et de mobilité avec conservation relative des fonctions végétatives. Dans le cadre de cette expérimentation, nous avons été tentés d'utiliser le terme, impropre, de tétanie tant l'animal semble rigide et figé. L'atonie semble être un effet subléthal fortement lié à la nature toxique du NP 5. Déjà dans des tests concernant l'homologation des dispersants pétroliers cet état a été largement observé. Il se caractérise par une raideur totale de l'animal qui repose sur le côté ; un stimulus, plus ou moins violent selon la gravité de cet état, provoque généralement une réaction très brève de l'animal qui effectue une nage désordonnée aboutissant à nouveau à cet état atonique. Dans les cas les plus avancés, aux concentrations en polluant les plus élevées, l'animal ne réagit plus à aucun stimulus, seuls de rares battements cardiaques et quelques mouvements respiratoires attestent que la civelle n'est pas morte.

c) La nidification

C'est assimilable, en aquarium, au comportement fouisseur de l'animal dans le sédiment dans son milieu naturel. Effectivement, le mouvement migratoire anadrome de la civelle, cesse dès l'apparition du jour et fait place à un comportement d'enfouissement dans le sédiment avec un préférence pour les sédiments de grande granulométrie (8 à 16 mm) qui offrent un certain nombre d'espaces interstitiels favorables à une pénétration rapide des civelles (LECONTE-FINIGER, 1983). D'autre part, et contrairement à l'adulte qui possède un comportement individuel, on observe facilement chez la civelle une tendance au grégairisme (nage et comportement nidificateur groupés) qui serait en rapport avec les découvertes récentes de phéromones produites par le mucus et les produits de dégradation du métabolisme des civelles ; la nature et le rôle de ces substances agiraient à la fois comme facteur d'attraction et de cohésion de l'ensemble des animaux (SAGLIO, 1982). On note, qu'en aquarium, un tube déposé sur le fond est immédiatement colonisé pendant le jour, comme abri, mais qu'en soirée dès qu'il fait sombre les animaux quittent leur refuge et nagent activement (MOHR, 1970).

Dans le cas précis de notre expérimentation, nous avons placé dans un cristalliseur, pour chaque concentration, un double tube de PVC de 85 mm de long et 12 mm de diamètre. Dès les premières minutes de leur introduction dans le bac, la majorité des civelles se regroupe essentiellement dans un seul des deux tubes ne laissant apparaître que la tête.

C'est, tous les jours, la modification de ce comportement qui sera notée en comptabilisant le nombre d'animaux nidifiés.

d) La nage

La nage est, bien entendu, la réaction locomotrice essentielle chez les poissons. Cette réaction consiste en la répétition d'actes simples identiques et alternés sous le contrôle du système nerveux chez les vertébrés (BLANCHETEAU, 1972). Il est donc probable qu'une atteinte éventuelle de ce système entraîne des modifications notables de la nage. WILDISH (1973) considère que l'amplitude de la nage, sa périodicité sont des bons indicateurs de l'atteinte du comportement de nombreux téléostéens en présence de polluants, particulièrement les tensio-actifs non-ioniques.

A chaque observation quotidienne, nous notons le nombre d'individus nageant, c'est-à-dire en déplacement dans la colonne d'eau ou en surface.

e) Animaux "au repos"

Ce paramètre peut être considéré comme complémentaire du précédent en ce sens qu'il s'agit là d'animaux posés sur le fond du cristallisoir dans une attitude caractéristique : corps immobile en "S", le premier tiers du corps et la tête légèrement relevés mais le plus léger stimulus provoque leur déplacement et les assimile de ce fait aux animaux nageant. Il est probable que dans l'hypothèse où nous aurions placé des tubes-refuge dans tous les cristallisoirs, ces civelles définies comme étant au repos, se seraient nidifiées compte tenu du fait que les observations se font à la lumière, période de moindre activité pour ces animaux.

6°) Suivi histologique

Le suivi histologique de la branchie est étalé sur l'ensemble des 34 jours de l'expérimentation. Huit prélèvements ont été opérés aux jours : 6, 9, 14, 19, 21, 26, 29 et 34. A chaque prélèvement deux individus vivants sont sacrifiés par concentration et chez les témoins. La tête de l'animal est sectionnée puis fixée dans du Bouin pendant 3 à 4 jours.

Après deshydratation et imprégnation, la pièce est débitée au microtome en coupes de 5 μm d'épaisseur puis colorée au P.A.S. - Van Gieson - Bleu Alcian, coloration polychrome mettant en évidence les différentes structures tissulaires et cellulaires.

Pour résumer, à chaque concentration et pour le témoin correspondent 3 lots de 20 civelles répartis en trois cristallisoirs individualisés pour les différentes observations réalisées.

Nous précisons dans le tableau 1 le protocole expérimental que nous avons suivi pendant cette expérience en précisant pour chaque série les paramètres relevés. Rappelons que chaque cristallisoir contient au départ 20 civelles.

En marge de ces relevés quotidiens et en fonction des observations antérieures, nous avons mesuré à trois reprises (les 7e, 12e et 19ème jour) la diminution du rythme cardiaque chez les animaux comateux et nous l'avons comparée au rythme cardiaque des témoins. Enfin, nous avons pesé chaque lot en début d'expérience et nous avons procédé de même en fin d'expérimentation pour les animaux survivants (les animaux sont prélevés à l'épuisette puis égouttés pendant une minute sur un tapis éponge, avant la pesée). Ces deux dernières observations, rythme cardiaque et poids, complètent le tableau clinique des effets sublétaux.

1er bac Série toxicité	2eme bac Série histologie	3eme bac Série comportement
Mortalité	Histologie	Mortalité
	2 civelles fixées à	Nidification
	chaque prélèvement	
Coma	aux	Coma
	6e jour) avec	
	9e jour) polluant	
Repos	14e jour) exposition	Repos
	19e jour)	
	26e jour) sans	
Nage	29e jour) polluant	Nage
	34e jour) récupéra- tion	

Tableau 1. - Tableau synoptique des différents paramètres relevés quotidiennement pour chacune des concentrations et les témoins.

7°) Dosage du NP 5

La méthode utilisée dérive de celle de MILWIDSKY (1969) basée sur la spectrophotométrie du complexe de coloration bleue formé entre les oxydes d'éthylène et une solution de cobalthiocyanate d'ammonium. L'aspect délicat de cette méthode appliquée au dosage du NP 5 s'explique par la nécessité, en expérimentation sub létale, de tester des concentrations faibles (concentrations théoriques retenues : 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 mg/l) de ce produit toxique, or, à de telles teneurs, la méthode de MILWIDSKY est peu sensible et nécessite plusieurs étapes de concentration du tensio-actif. BOYER et al. (1977) ont mis au point la méthode de concentration suivante, appliquée au dosage de tensio-actif non-ionique dans le milieu : un litre de l'échantillon à doser est versé dans une sorte d'ampoule à décanter ("sublator" pour BOYER) auquel on ajoute 100 ml d'acétate d'éthyle (solvant extracteur) ; le passage du tensio-actif dans le solvant est activé par un gaz vecteur neutre, l'azote par exemple, diffusé en microbulles, à faible débit et pendant 20 mn par un verre fritté situé à la base de l'ampoule (fig. 2).

La phase organique (acétate d'éthyle + NP 5) est récupérée, le solvant est évaporé. La même opération est renouvelée trois fois dans le but d'extraire la majeure partie du tensio-actif de l'échantillon mais aussi de récupérer le tensio-actif adsorbé sur les parois de l'ampoule, ce qui, à des concentrations inférieures au mg/l n'est pas négligeable. Après évaporation du solvant, le NP 5 est à nouveau dissous dans du dichlorométhane auquel on ajoute le réactif cobalto-thiocyanate. La légère coloration bleue obtenue est lue à 620 nm et la valeur ramenée à une courbe étalon établie au préalable. La précision de cette méthode n'est pas excellente compte tenu de la nature du tensio-actif et de sa faible teneur dans le milieu mais elle est, à notre connaissance, la seule disponible actuellement qui ne nécessite pas un lourd appareillage.

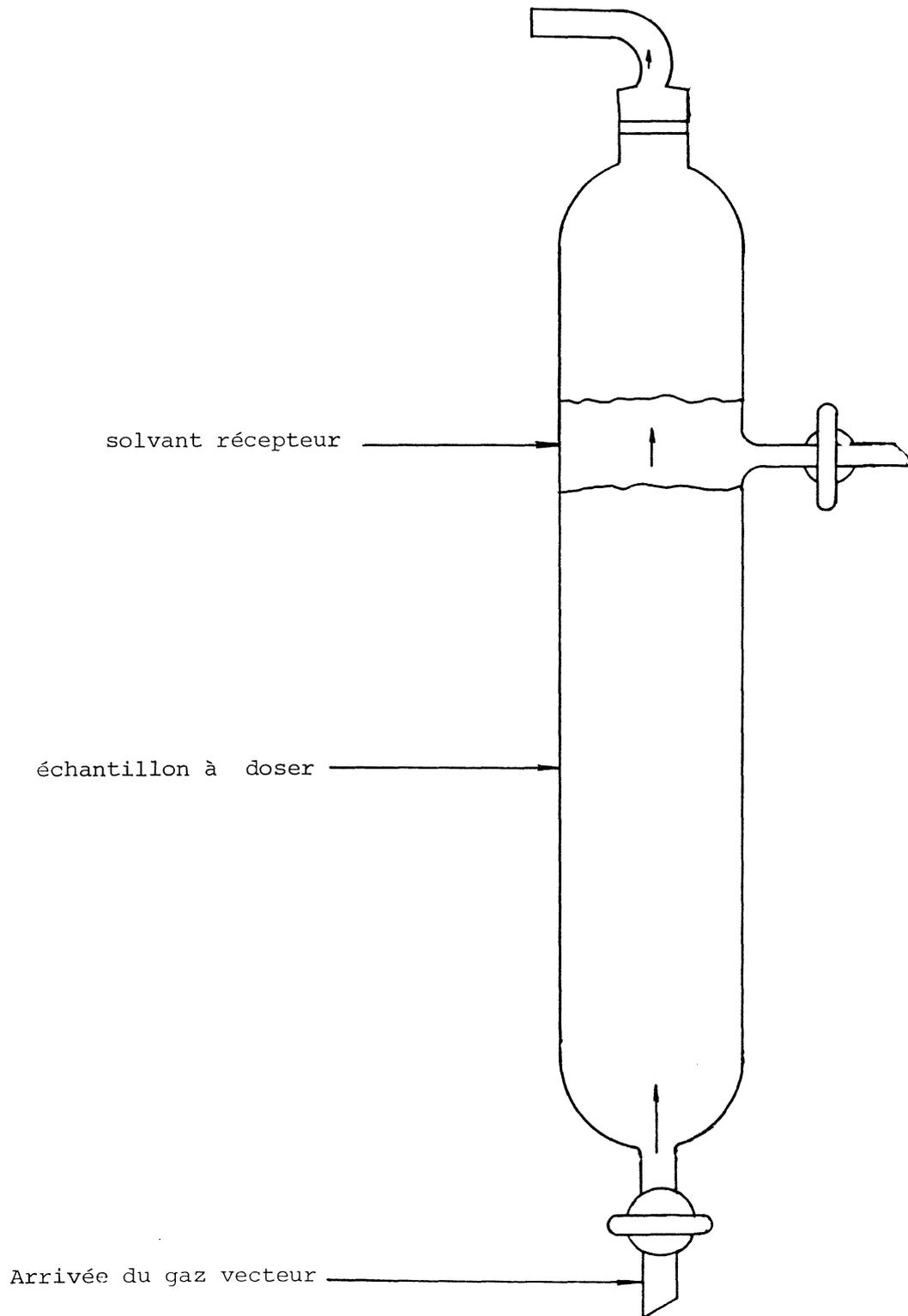


Fig. 2 - Ampoule à séparation de produits tensio-actifs (sublator).

Préparation de la solution mère

La préparation d'une solution concentrée d'un toxique est essentiellement dépendante de deux facteurs : d'une part la limite de solubilité du produit (très faible dans le cas des solvants par exemple), d'autre part les capacités de dilution de cette solution mère offerte par l'installation : il faut savoir en effet qu'un produit saturé en eau de mer à 100 mg/l ne pourra être testé à 50 mg/l qu'en mélangeant autant d'eau de mer que de solution concentrée en polluant, ce qui nécessiterait des quantités énormes de toxique.

Dans le cas précis du NP 5 et en fonction des concentrations souhaitées sur chaque rampe, deux solutions mères sont élaborées en eau de mer, l'une à 60 mg/l l'autre à 75 mg/l dans des barils de 25 litres, renouvelés toutes les 48 h et maintenus en agitation.

Les dosages n'ont été effectués qu'une fois pour les concentrations 0,6 mg/l et 0,8 mg/l (au 7^e jour) et deux fois pour les concentrations les plus faibles 0,2 mg/l et 0,4 mg/l, plus sujettes à fluctuations (au 14 et 19^e jour).

La limite dans la périodicité des dosages est imposée par les trois heures nécessaires à l'obtention d'une seule valeur (nous avons vu précédemment les exigences de la méthode de dosage), d'autre part l'imprécision de la technique appliquée au dosage de faibles teneurs nous oblige à exprimer les résultats sous forme de fourchettes de concentrations (tableau 2).

Date du prélèvement	Bac dosé	Concentration théorique	Concentration dosée
J. 7	Comportement	0,60 mg/l	0,60 mg/l
	Toxicité	0,80 mg/l	0,78 - 0,79 mg/l
J. 14	Comportement	0,20 mg/l	0,15 - 0,18 mg/l
	Comportement	0,40 mg/l	0,30 - 0,38 mg/l
J. 19	Toxicité	0,20 mg/l	0,15 - 0,18 mg/l
	Toxicité	0,40 mg/l	0,20 - 0,26 mg/l

Tableau 2. - Dosages du NP 5 dans les différents bacs par la méthode C.T.A.S. (MILWIDSKY 1969 - BOYER 1977).

8°) Méthodes statistiques

. Comparaisons de fréquence

Les fréquences de mortalité obtenues pour 0,2 ; 0,4 ; 0,6 et 0,8 mg/l ainsi que celles des témoins ont été testées 2 à 2, par le test de KOLMOGOROFF - SMIRNOV. Le principe de ce test consiste à vérifier l'hypothèse nulle (Ho) selon laquelle les deux distributions testées sont identiques. Ho est rejetée, si, en un point, la valeur absolue de la différence |D| entre les deux courbes des pourcentages cumulés est trop importante pour être attribuée au hasard : la valeur observée |D| est comparée à une valeur critique

$$\lambda (1 - \alpha) \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}$$

où n1 et n2 sont respectivement les effectifs de la première et de la seconde distribution de fréquence testée (ici n1 = n2). $\lambda (1 - \alpha)$ est donné par STANGE et HENNING (1966) après SMIRNOW (1948) [in FAO Fisheries technical paper n° 182 (1979)].

1 - α	0,95	0,99
$\lambda (1 - \alpha)$	1,36	1,63

. LT 50

Le temps létal 50 % (LT 50), correspondant au temps nécessaire pour que meurent 50 % des animaux, a été déterminé mathématiquement par la méthode des probits de BLISS (1938).

III - RESULTATS

1°) Effets létaux du NP 5 (figures 3, 4)

a) Distribution des mortalités cumulées suivant les conditions expérimentales

L'observation entre les courbes de mortalités cumulées obtenues dans les conditions expérimentales du bac "comportement" aux différentes concentrations et les résultats enregistrés dans le bac "toxicité" laisse apparaître un moindre effet toxique du NP 5 dans le premier cas. Afin de savoir s'il y avait nécessité d'étudier séparément les données des bacs "toxicité" et "comportement", nous les avons comparés, deux à deux, par le test de KOLMOGOROFF-SMIRNOV. Les résultats sont présentés dans le tableau n° 3.

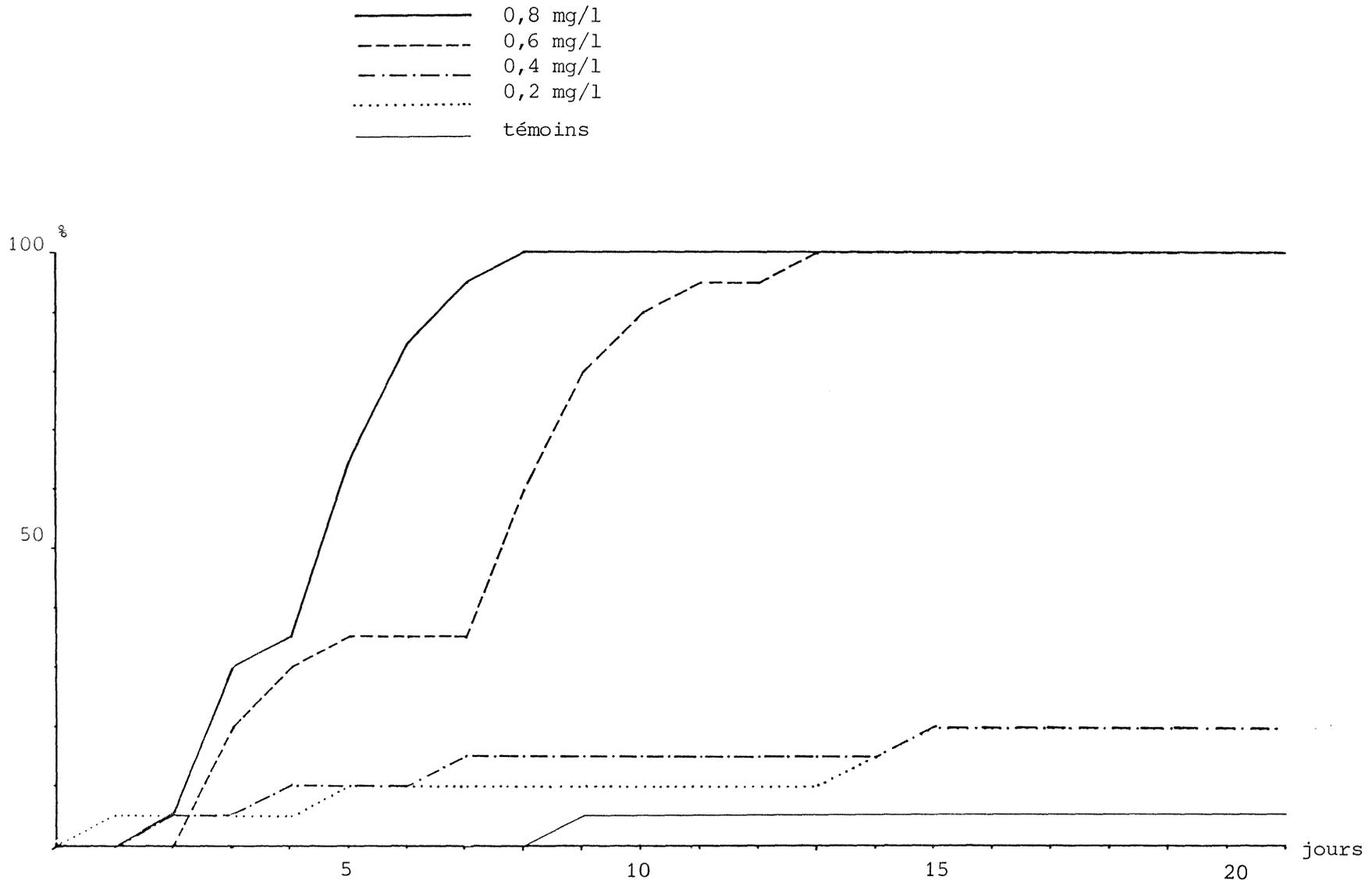


Fig. 3 - Mortalité cumulée dans les bacs "toxicité".

——— 0,8 mg/l
 - - - 0,6 mg/l
 - · - · 0,4 mg/l
 ······ 0,2 mg/l
 ——— témoins

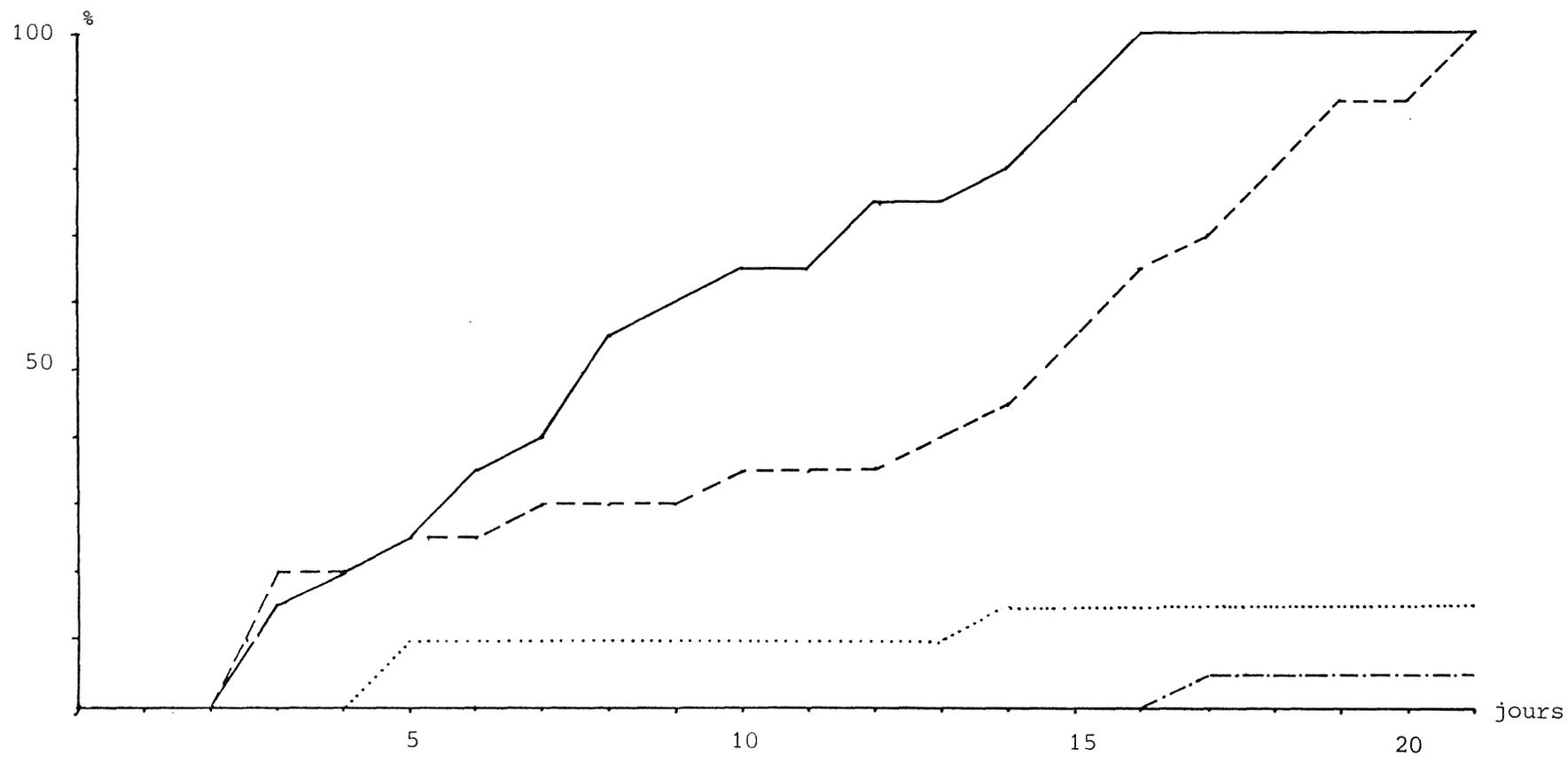


Fig. 4 - Pourcentage de mortalité cumulée dans les bacs "comportement".

Concentration	n	valeurs observées D	valeurs critiques (5 %)	valeurs critiques (1 %)	Différences
0,8 mg/l	16	0,5	0,48	0,58	oui à 5 % non à 1 %
0,6 mg/l	21	0,6	0,42	0,50	oui
0,4 mg/l	21	0,2	0,42	0,50	non
0,2 mg/l	21	0,05	0,42	0,50	non

Tableau 3. - Comparaison des distributions de mortalités cumulées observées à différentes concentrations entre bacs "comportement" et bacs "toxicité".

Pour 0,8 et 0,6 mg/l la différence observée entre les résultats de ces deux types de conditions expérimentales sont significativement différents à la valeur critique, au seuil de 5 %. Pour 0,8 mg/l cette différence n'est pas significative lorsqu'on abaisse le seuil de signification à 1 %. Il en est de même, et cela quelle que soit la précision, pour 0,2 et 0,4 mg/l. Cependant, pour ces deux dernières concentrations les mortalités enregistrées sont faibles dans toutes les conditions expérimentales et n'apparaissent pas significativement différentes de celles obtenues en condition "témoin" (lorsqu'il y en a eu : bac "toxicité"), (tableaux 4 et 5).

	n	D	(5 %)	(1 %)	Différences
Bacs toxicité	21	0,15	0,42	0,50	non
Bacs comportement	21	0,15	0,42	0,50	non
Bacs toxicité + comportement	21	0,15	0,42	0,50	non

Tableau 4. - Comparaison des distributions de mortalités cumulées entre 0,2 mg/l et témoin suivant différentes conditions expérimentales.

	n	D	(5 %)	(1 %)	Différences
Bacs toxicité	21	0,15	0,42	0,50	non
Bacs comportement	21	0,05	0,42	0,50	non
Bacs toxicité + comportement	21	0,1	0,42	0,50	non

Tableau 5. - Comparaison des distributions de mortalités cumulées entre 0,4 mg/l et témoin suivant différentes conditions expérimentales.

A 0,2 et 0,4 mg/l la toxicité directe du NP 5 est limitée ; il est probable que ce résultat conduise alors à ne pas pouvoir différencier statistiquement les deux séries de bacs expérimentaux, de même qu'il n'est pas possible de juger de l'importance de l'effet létal entre 0,2 et 0,4 mg/l (tableau 6).

	n	D	(5 %)	(1 %)	Différences
Bacs toxicité	21	0,05	0,42	0,50	non
Bacs comportement	21	0,15	0,42	0,50	non
Bacs toxicité + comportement	21	0,075	0,42	0,50	non

Tableau 6. - Comparaison des distributions de mortalités cumulées entre 0,2 mg/l et 0,4 mg/l suivant différentes conditions expérimentales.

On note cependant que dans tous les cas de concentrations et même en condition "témoin", les résultats obtenus en bac "toxicité" sont plus forts qu'en bac "comportement". Cela nous conduit à poursuivre le traitement de nos résultats en présentant séparément les données de ces deux conditions expérimentales.

Les différences entre fréquences cumulées de mortalité à 0,4 et 0,6 mg/l, très nettes sur les figures 3 et 4, sont statistiquement démontrées par le test de KOLMOGOROFF-SMIRNOV (tableau 7).

	n	D	(5 %)	(1 %)	Différences
Bacs toxicité	21	0,85	0,42	0,50	oui
Bacs comportement	21	0,95	0,42	0,50	oui

Tableau 7. - Comparaison des distributions de mortalités cumulées entre 0,4 mg/l et 0,6 mg/l suivant différentes conditions expérimentales.

De même, entre 0,6 et 0,8 mg/l les différences sont significatives à 5 % dans les deux séries de bacs ceci n'est, pas contre, pas vrai au seuil de précision de 1 % (tableau 8).

	n	D	(5 %)	(1 %)	Différences
Bacs toxicité	13	0,55	0,53	0,63	oui à 5 % non à 1 %
Bacs comportement	21	0,45	0,42	0,50	oui à 5 % non à 1 %

Tableau 8. - Comparaison des distributions de mortalités cumulées entre 0,6 mg/l et 0,8 mg/l suivant différentes conditions expérimentales.

En résumé, le NP 5 apparaît très toxique à 0,6 mg/l et 0,8 mg/l et faiblement toxique à 0,2 et 0,4 mg/l. Les réponses enregistrées ne suivent pas une progression linéaire au contraire des concentrations ; en effet, celles-ci ne se situent pas dans la zone d'inflexion de la courbe de type sigmoïde résultant de la fonction liant mortalités et concentrations.

b) LT 50

Nous avons calculé les temps létaux 50 % pour 0,6 et 0,8 mg/l (tableau 9). En effet, à ces deux concentrations, l'ensemble des individus sont morts pendant la durée de l'expérience (21 jours) : respectivement en 8 (bac "toxicité") et 16 jours (bac "comportement") à 0,8 mg/l, 12 (bac "toxicité") et 21 jours (bac "comportement").

	LT 50 à 0,6 mg/l	LT 50 à 0,8 mg/l
Bacs toxicité	143,25 \pm 66,52 heures	93,28 \pm 11,42 heures
Bacs comportement	267,30 \pm 27,13 heures	176,60 \pm 13,84 heures

Tableau 9. - LT 50 du NP5 à 0,6 et 0,8 mg/l dans les différentes conditions expérimentales.

De nouveau nous constatons que les résultats obtenus dans les bacs "toxicité" sont très différents de ceux des bacs "comportement". Dans ce dernier cas la durée de survie est doublée.

L'analyse des résultats de mortalité met en évidence un effet toxique plus marqué du NP 5 aux différentes concentrations dans les bacs "toxicité". Si nous admettons que ces bacs reçoivent pour une même concentration la même quantité de toxique (même pompe, même solution-mère, même débit d'eau de mer), il apparaît que l'introduction des deux tubes en PVC a probablement ralenti l'effet de stress subi par les animaux en favorisant un comportement naturel de la civelle, c'est-à-dire en renforçant la propension de ce poisson à s'abriter et à se grouper. Il est tout à fait envisageable que dans ces conditions l'individu est, dans une relative mesure, moins sensible au polluant.

2°) Effets sublétaux du NP 5 sur le comportement

a) Effets comateux (fig. 5, 6) (photo 2)

Le coma est un effet pathologique caractérisé par une perte de sensibilité et de mobilité avec conservation relative des fonctions végétatives ; cette perte est plus ou moins accentuée selon la concentration en nonylphénol, le temps de contact avec celui-ci et la sensibilité de chaque individu au polluant. De manière générale nous avons relevé deux états comateux distincts : dans un premier temps la civelle présentant des symptômes décrits précédemment (II - 5 - b), réagit cependant à un léger stimulus mécanique, au

——— 0,8 mg/l
 - - - 0,6 mg/l
 - · - · - 0,4 mg/l
 ····· 0,2 mg/l
 ——— témoins

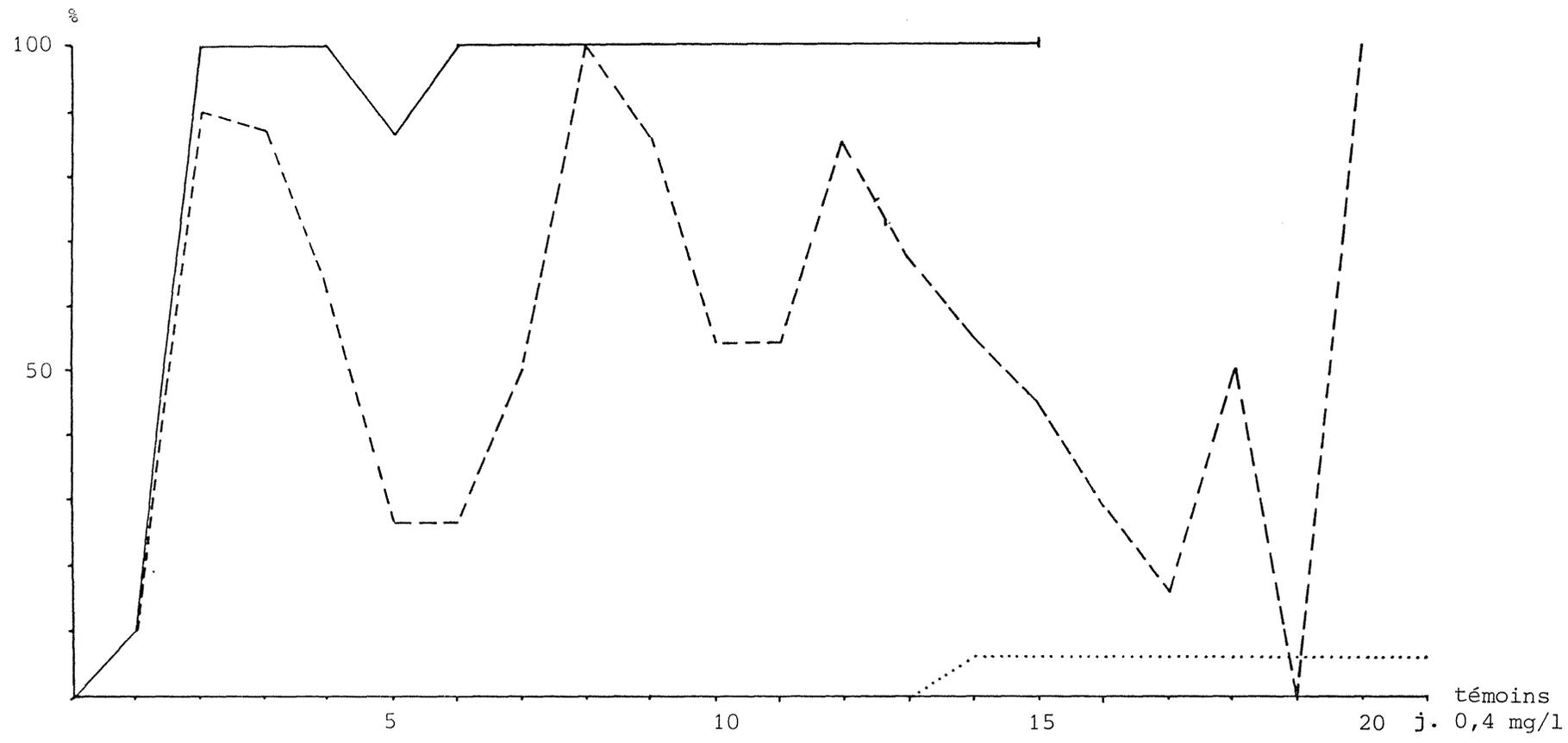


Fig. 5 - Pourcentage cumulé d'animaux comateux dans les bacs "comportement".

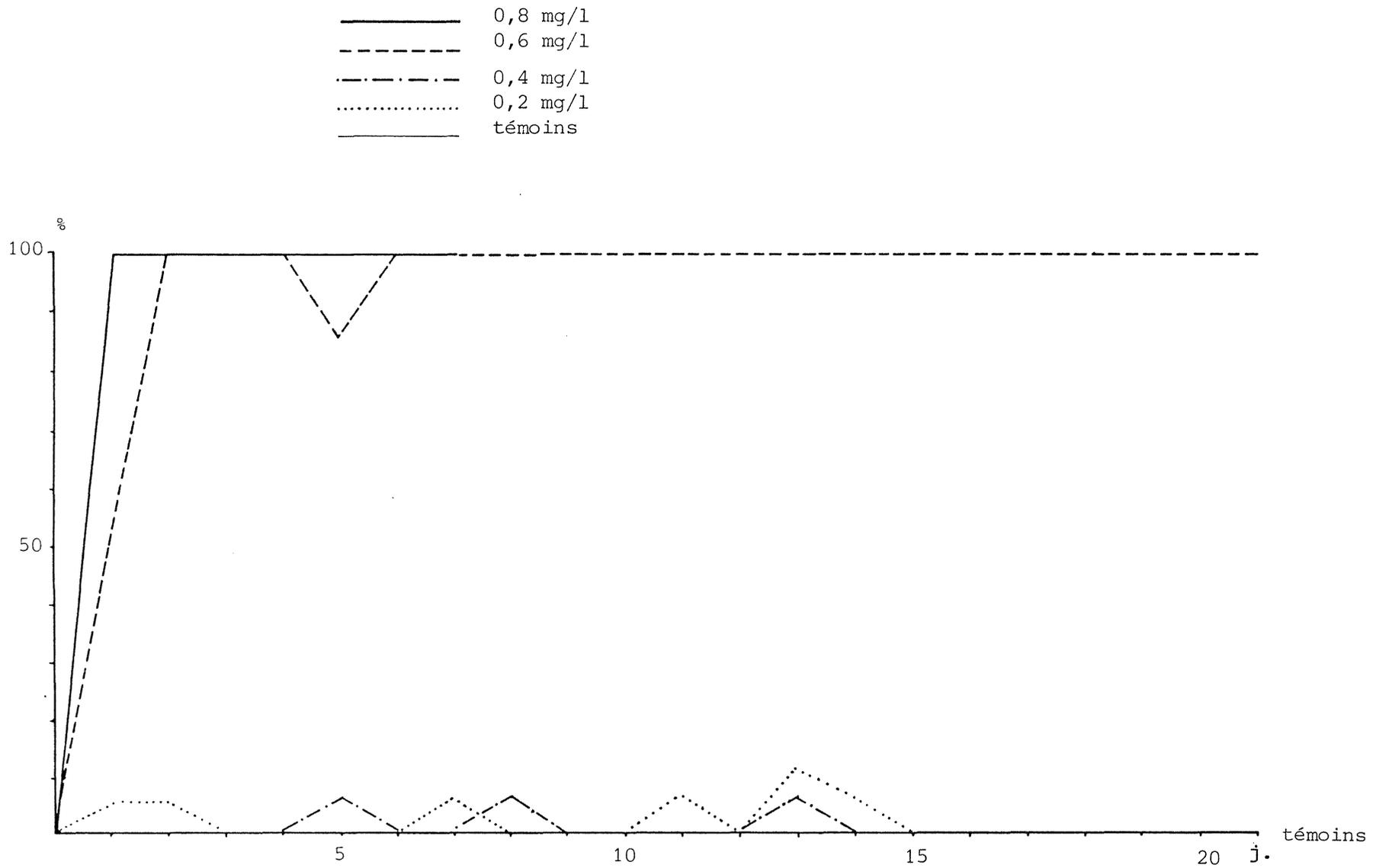


Fig. 6 - Pourcentage cumulé d'animaux comateux dans les bacs "toxicologie".

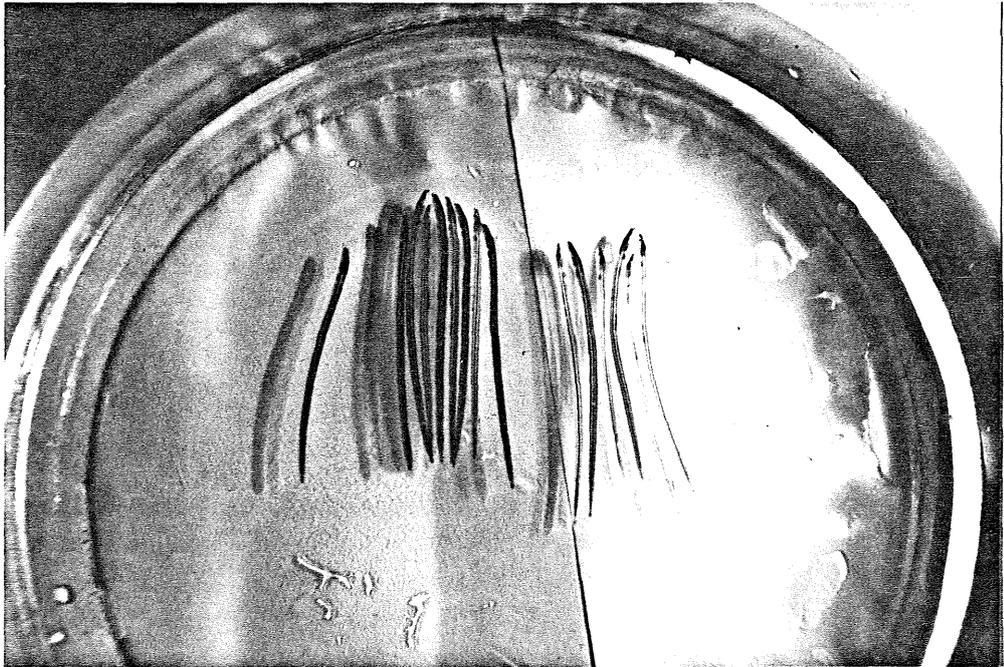


Photo 2 -

A gauche : animaux comateux à 0,8 mg/l au 8ème jour
A droite : animaux anesthésiés (au MS 222 Sandoz)

fur et à mesure de l'intoxication l'animal perd ce réflexe et ne conserve que des fonctions respiratoires et cardiaques de plus en plus ralenties. On peut donc parler dans un premier temps de coma léger, en second lieu de coma profond. La représentation graphique du pourcentage d'animaux comateux par rapport aux animaux survivants en fonction du temps et pour chaque concentration nous conduit aux constatations suivantes :

Animaux soumis à 0,8 mg/l

Dans les deux cas "comportement" et "toxicité", l'effet du nonylphénol NP 5 est rapide et touche la grande majorité de la population testée. Dès les premières 24 h, 50 % des civelles soumises à cette concentration présentent cet état. Après 48 h d'exposition et jusqu'à mortalité totale des animaux, le pourcentage d'individus dans le coma atteint 100 %. Les observations quotidiennes nous amènent une autre remarque : les animaux présentent, à cette concentration, la phase la plus avancée du coma, caractérisée par la perte totale du réflexe de fuite, même après un violent stimulus obtenu en pinçant la partie caudale de l'animal. On peut parler ici d'état comateux profond. En tout état de cause, à 0,8 mg/l de NP 5 l'état comateux préfigure l'intoxication et aboutit inexorablement, en 16 jours à la mort de l'ensemble des civelles.

Animaux soumis à 0,6 mg/l

L'effet du toxique, s'il est plus lent à se manifester (10 % des animaux à 24 h) atteint néanmoins 90 % à 100 % des individus après 48 h de contact. A cette concentration nous observons une légère rémission entre le 4ème et le 6ème jour dans le bac "toxicité", rémission coïncidente dans le bac de "comportement", avec cependant une plus grande amplitude. Cette phase de "récupération" est probablement liée à une diminution momentanée de la concentration en nonylphénol dans le milieu (arrêt de la pompe due à une panne électrique). Cette baisse provisoire a permis un retour à une activité d'à peu près 60 % des individus dans le bac "comportement" ; cette rémission, concordante mais moins sensible dans le bac "toxicité" peut s'expliquer dans le cadre des hypothèses que nous émettions précédemment, à savoir un effet plus toxique du NP 5 dans les bacs "toxicité" et une récupération plus faible puisqu'elle ne concerne que 15 % des individus. Une seconde période de rémission, qui a probablement pour origine le même incident, apparaît entre le 8ème et le 10ème jour dans le bac "comportement" mais de façon moins spectaculaire puisqu'elle ne profite qu'à 40 % des individus. Quant à la partie terminale de la courbe, elle semble délicate à interpréter compte tenu de la mortalité qui atteint en priorité les animaux les plus faibles et qui laisse à penser que les animaux les plus résistants sont plus ou moins sensibles aux effets comateux du NP 5 pendant cette période. Effectivement et contrairement aux observations faites à 0,8 mg/l où les animaux ont rapidement présenté les caractéristiques du coma profond, les civelles exposées à 0,6 mg/l présentent des manifestations comateuses diverses, certaines formes plus légères font que l'animal bien qu'immobile et rigide sur le flanc, reste sensible aux modifications de son environnement : un choc léger, la lumière subite provoquent un retour bref à un comportement normal de fuite. Le glissement de cette forme légère à un coma plus profond est plus lent qu'à 0,8 mg/l et aussi plus fluctuant bien que l'évolution dans le temps est inéluctable. Les effets comateux profonds suivent les formes de coma léger et aboutissent à la mort progressive de tous les individus jusqu'au 21ème jour.

Animaux soumis à 0,2 et 0,4 mg/l

Que ce soit dans les bacs "toxicité" ou dans les bacs "comportement", les effets du toxique provoquant cet état comateux sont à ces concentrations peu sensibles. Nous notons à nouveau un effet moins toxique du NP 5 dans les bacs "comportement" où les premiers effets n'apparaissent qu'au 12^{ème} jour, ce qui renforce nos premières constatations quant à une diminution de l'effet toxique dans ces bacs. Par contre, dans les bacs "toxicité", si les effets apparaissent plus tôt ils restent peu importants et ne se limitent qu'à quelques individus. A l'opposé des fortes concentrations, peu d'animaux semblent, en effet, touchés à 0,2 et 0,4 mg/l et les états comateux constatés sont légers et souvent réversibles aucun signe du coma profond n'a été enregistré et les mortalités ne font pas systématiquement suite à un état comateux. D'autre part aucune différence significative n'apparaît entre les deux concentrations. Il est probable que le toxique ne frappe que les individus les plus faibles.

b) Effets sur la nidification (fig. 7)

Nous avons vu que la nidification s'apparente à une propension naturelle de l'animal à se réfugier avec ses congénères dans tout ce qui peut constituer un abri. Cette attitude qui associe la mobilité (nage), la phototaxie négative développée par l'animal ainsi que son comportement grégaire, peut être fortement perturbée par la présence d'un polluant dans son environnement.

Animaux soumis à 0,8 mg/l de NP 5

Si 50 % des animaux sont nidifiés à 24 h, les effets comateux observés ont entraîné l'immobilisation des 50 % restant. Dès le 3^{ème} jour, l'ensemble des animaux présente les caractéristiques du coma, il est évident, dans ces conditions, que tout déplacement de la civelle vers le tube nidificateur est impossible, il en est de même pour la suite de l'expérimentation puisque chaque jour le pourcentage d'animaux dans le coma atteint 100 % des animaux survivants.

Animaux soumis à 0,6 mg/l de NP 5

La représentation graphique des relevés quotidiens montre qu'à partir de 40 % d'animaux nidifiés à 24 h, nous observons une chute rapide de ce pourcentage à 48 h suivie d'une reprise progressive de la nidification. Les fluctuations de ce nombre sont nombreuses sur les 21 jours de l'expérimentation sans qu'aucune explication ne soit réellement satisfaisante. Nous notons à cette concentration essentiellement deux paramètres : les animaux étant soit dans le coma, soit nidifiés. De manière générale, on peut admettre que 30 % des animaux survivants soumis à 0,60 mg/l de NP 5 conservent leurs facultés de nidification et donc, a priori, de phototaxie et de mobilité mais les fluctuations que subit ce chiffre restent difficilement interprétables du fait que la nidification est un paramètre fragile, délicat à mesurer. Le moindre stress infligé aux civelles (vibrations, éclairage, etc...) modifie rapidement

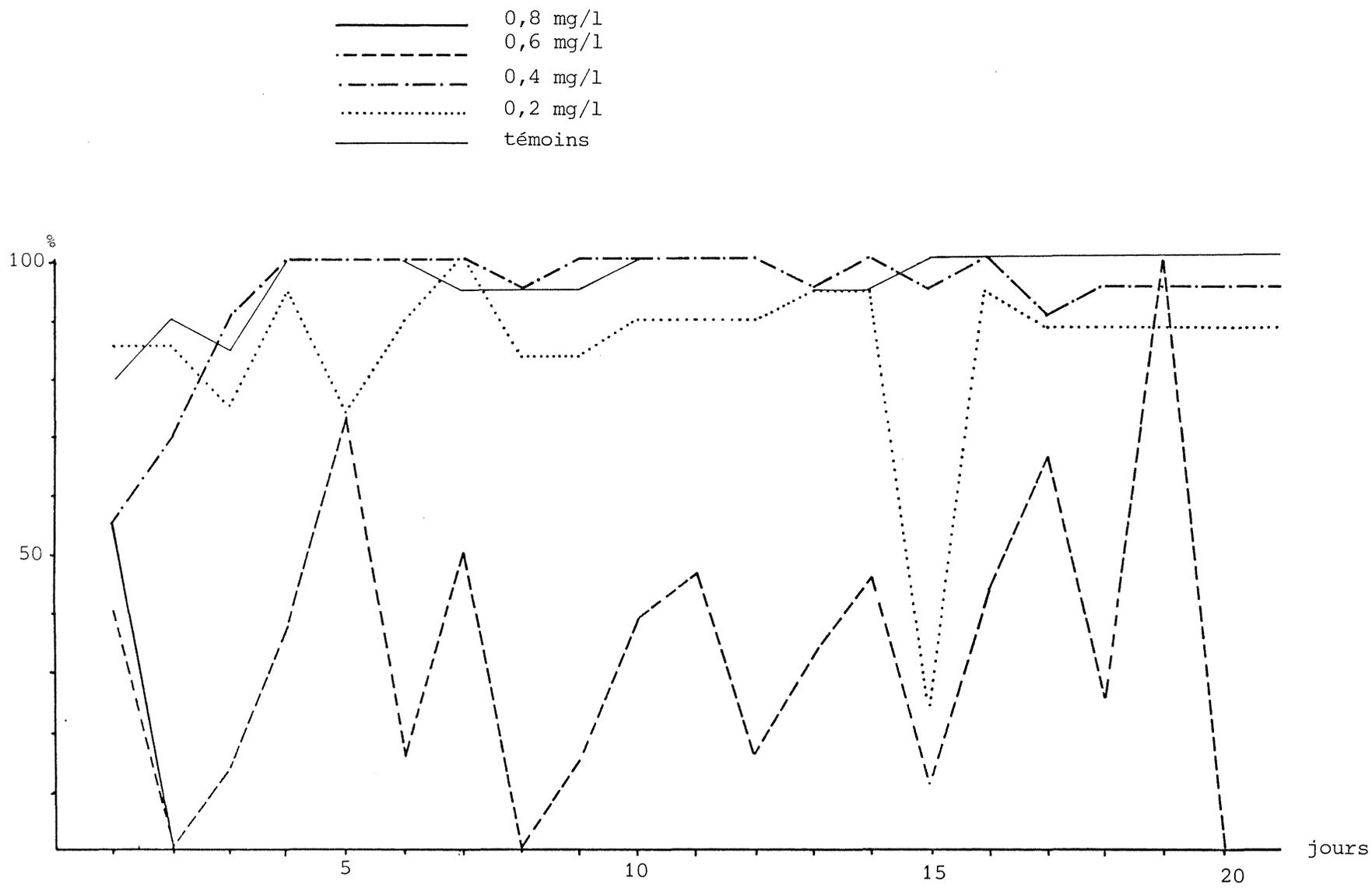


Fig. 7 - Pourcentage cumulé d'animaux nidifiés.

leur comportement et provoque une sortie du tube nidificateur et l'animal se fige dans une attitude défensive sur le fond du cristalliseur (attitude semblable à celle qualifiée de "repos" dans d'autres bacs). Toutefois en fin d'expérience (du 15^{ème} au 18^{ème} jour) nous voyons apparaître des animaux qui bien que ne subissant pas les effets comateux du NP 5, ne nidifient plus. Malheureusement, aucune observation complémentaire ne nous permet d'interpréter cette phase comme une étape intermédiaire dans l'intoxication, entre les animaux comateux et les animaux nidifiés. Enfin, sur l'ensemble du test, nous n'avons jamais enregistré d'animaux nageants dans cette série.

Animaux soumis à 0,2 et 0,4 mg/l de NP 5

Parallèlement aux observations notées précédemment dans l'étude des effets comateux, nous constatons un léger effet du toxique à 0,2 mg/l dans les premiers jours mais il semble qu'ensuite les évolutions, à ces deux concentrations, soient très semblables à celles des témoins ou la nidification se situe entre 90 % et 100 % des animaux.

c) Animaux nageants - Animaux au repos (fig. 8, 9, 10, 11)

L'étude du suivi des effets sur la nage et le repos des animaux n'est pas facilement exploitable et les effets éventuels du toxique sur ces paramètres sont dominés par l'effet comateux du NP 5. Les remarques précédentes, faites à 0,6 et 0,8 mg/l, valent aussi dans ce cas, les effets du tensio-actif entraînant, dès le deuxième jour, l'ensemble des animaux dans le coma. On retrouve aussi les similitudes déjà observées par les autres paramètres entre les témoins et les animaux soumis à 0,2 et 0,4 mg/l. Les témoins présentant toutefois une plus grande activité de nage.

Dans les bacs "comportement", la situation est différente puisque les animaux disposent d'une possibilité préférentielle de refuge de sorte que l'ensemble des animaux nidifie à 0,2 et 0,4 mg/l et que par contre à 0,6 et 0,8 mg/l les animaux meurent après une période de coma. La même observation concernant le coma et la mort s'applique aux bacs "toxicité". Les témoins faisant preuve d'un maximum d'activité par rapport aux animaux soumis à 0,2 et 0,4 mg/l, tandis qu'aux plus fortes concentrations du toxique les animaux en état comateux meurent rapidement.

d) Effet sur le rythme cardiaque

Les diminutions spectaculaires du rythme cardiaque enregistrées lors des premiers travaux sur la toxicité des nonylphénols ont été reprises et quantifiées. Les difficultés rencontrées dans le comptage des battements cardiaques chez les témoins sont liées à l'extrême vivacité avec laquelle l'animal se déplace, pour cette raison, la fréquence des battements est notée pendant 15 ou 20 secondes, les chiffres étant ramenés au rythme cardiaque à la minute.

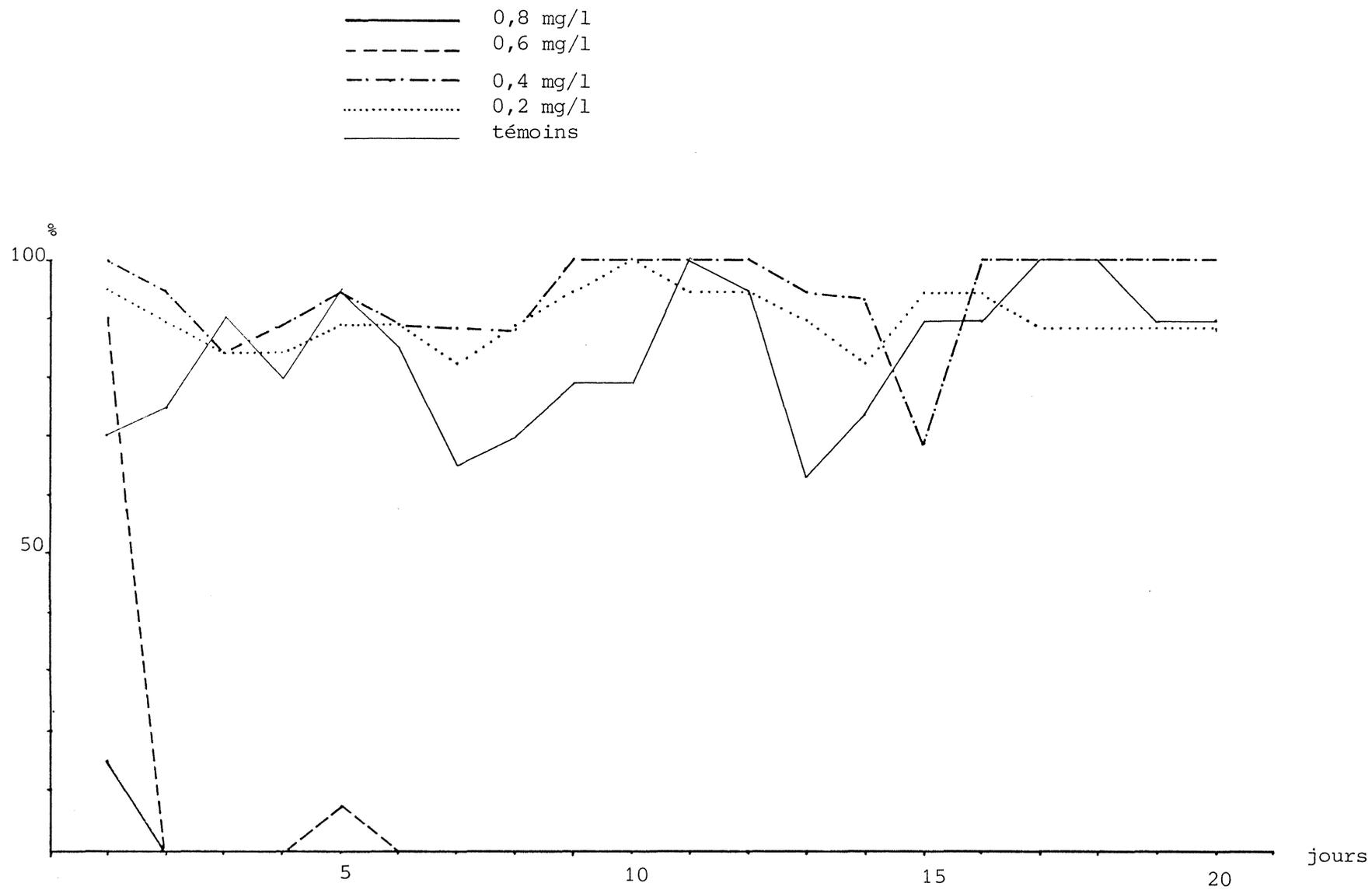


Fig. 8 - Pourcentage cumulé d'animaux au repos dans les bacs "toxicologie".

——— 0,8 mg/l
 - - - 0,6 mg/l
 - · - · 0,4 mg/l
 ····· 0,2 mg/l
 ——— témoins

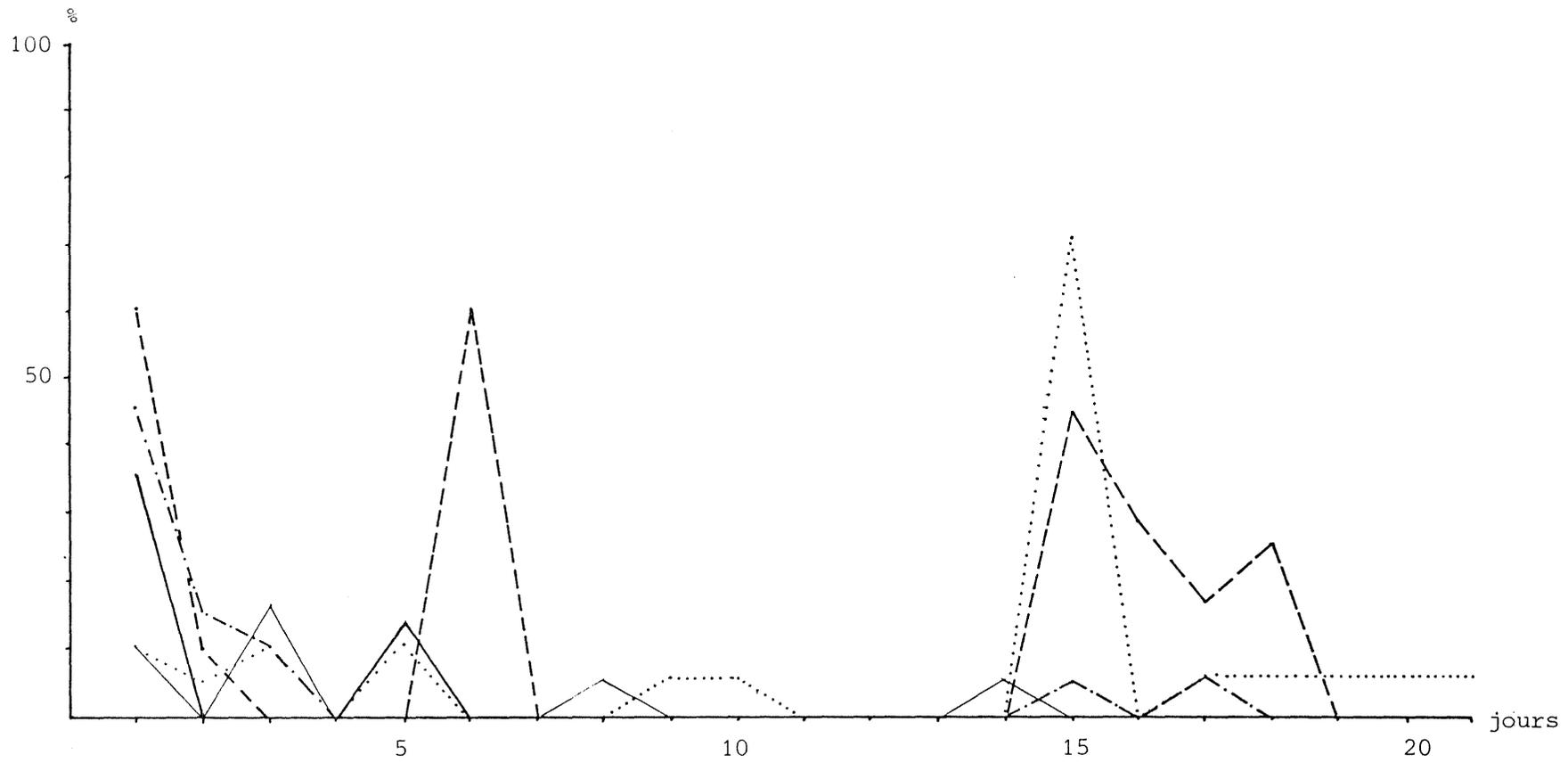


Fig. 9 - Pourcentage cumulé d'animaux au repos dans les bacs "comportement".

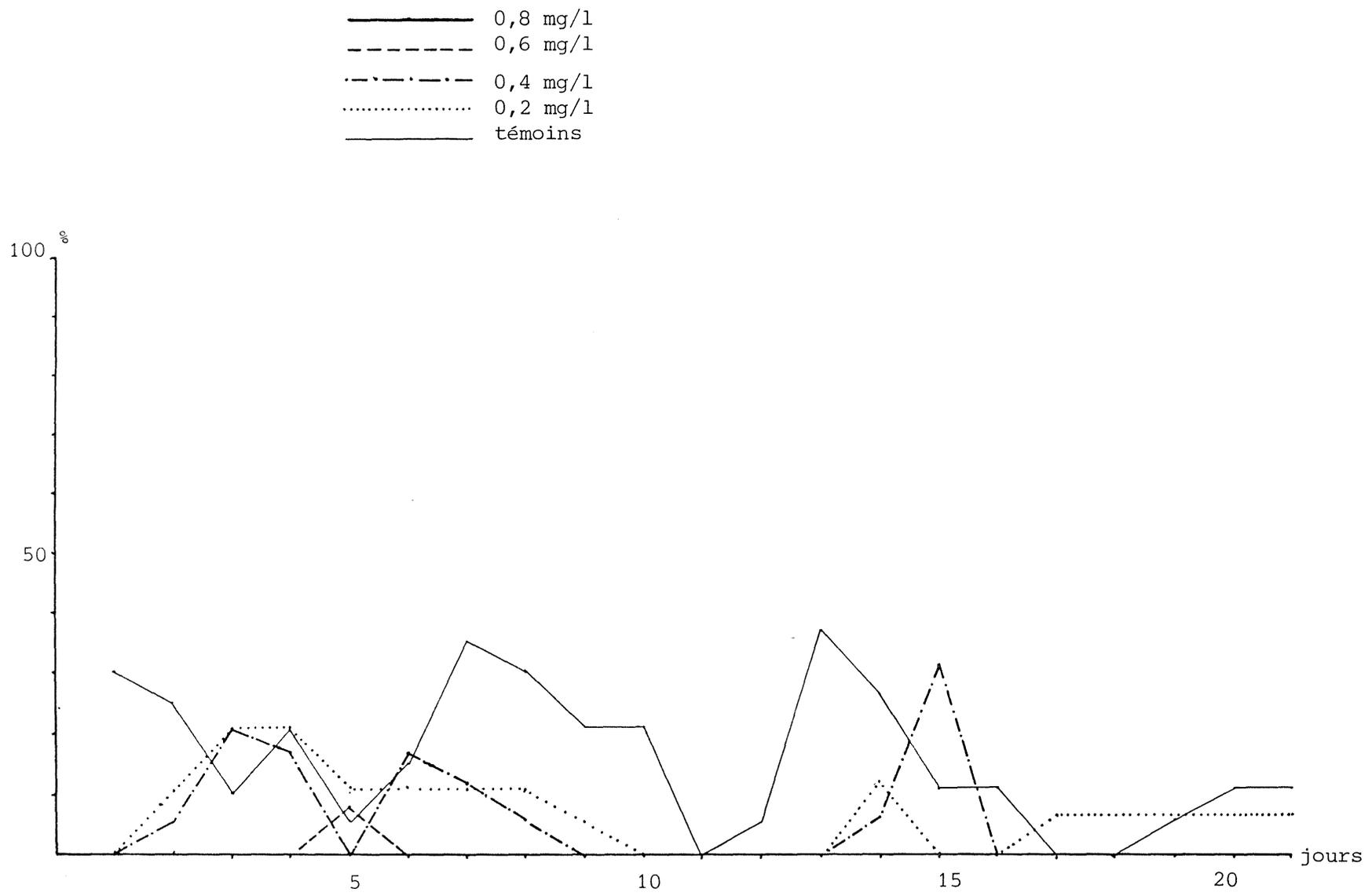


Fig. 10 - Pourcentage d'animaux nageants dans les bacs "toxicité".

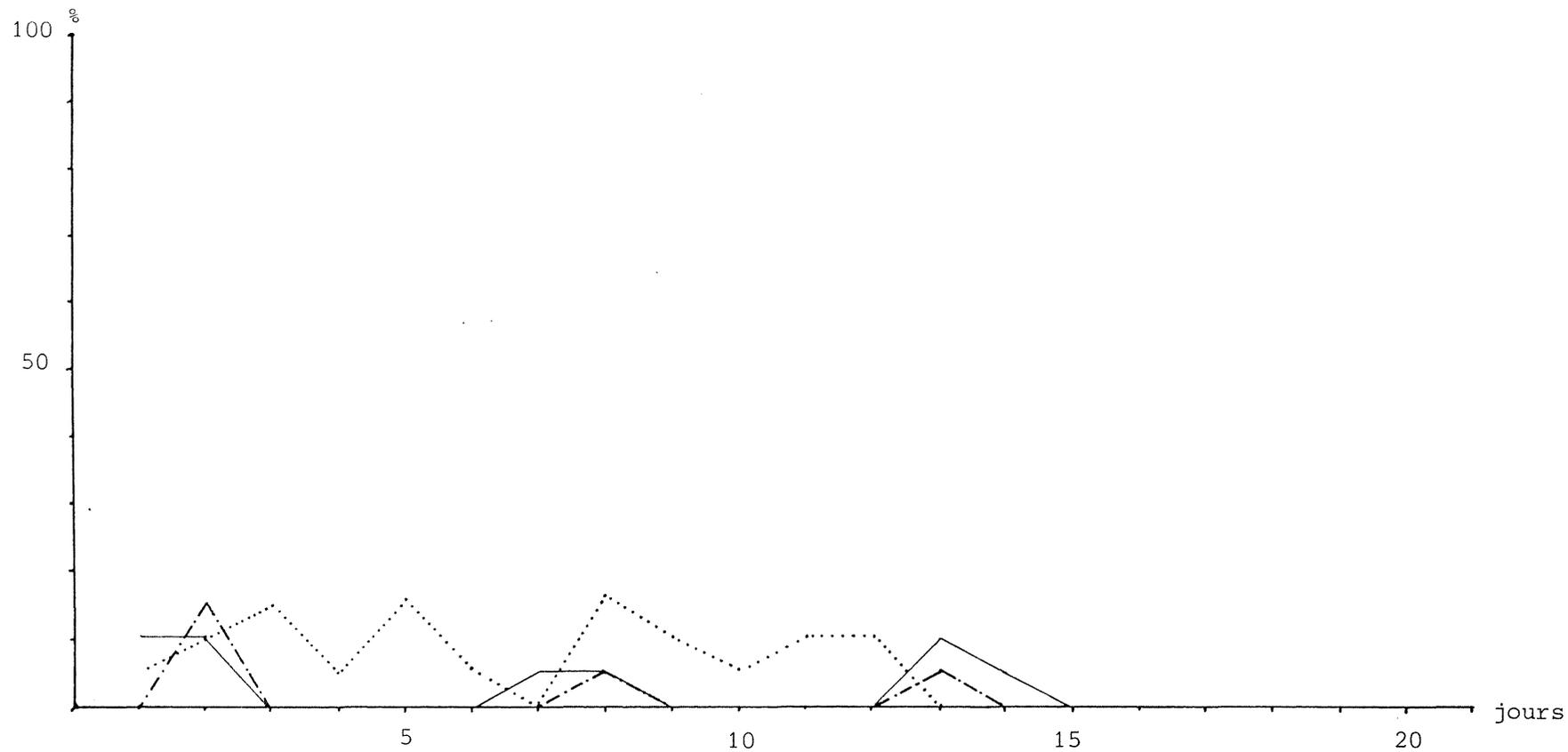
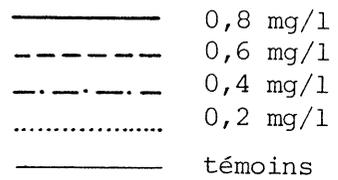


Fig. 11 - Pourcentage d'animaux nageants dans les bacs "comportement".

Plusieurs techniques ont été appliquées chez les témoins, pour tenter de les piéger puis de les immobiliser, mais le stress de la capture a, en tout cas, provoqué une perturbation du rythme cardiaque, et seule l'observation de l'animal dans le milieu donne les valeurs correctes.

Les relevés sur les animaux comateux sont évidemment plus aisés, l'animal étant totalement immobile. Les chiffres ainsi obtenus en 1985 et au cours de cette expérimentation sont regroupés dans le tableau 10.

Témoins 1985	Témoins 1986	N P 12 en mg/l (1985)			N P 5 en mg/l (1986)					
		6	8	10	0,6			0,8		
					2 j	7 j	12 j	2 j	7 j	12 j
52	48)	20	20	18	24	24	18	15	12	30
56) 54) 54	24	20	10	18	17	24	18	20	24
66) 60)	18	22	22	22	20	20	22	21	28
64) 54)	20	26	16	20	22	26	20	19	21
69) 60) 54	24	26	18	18	20		16	20	
) 48)									
moyenne/ minute										
61,4	54	21,2	22,8	16,8	20,4	20,6	22	18,2	18,4	25,75
% de diminution par rapport aux témoins		-65,5	-62,8	-72,6	-62,2	-61,8	-59,3	-66,3	-66	-52,4

Tableau 10. - Evolution du rythme cardiaque chez les animaux soumis à deux nonylphénols polyéthoxylés (NP 5 / NP 12).

La chute du rythme cardiaque est frappante puisqu'en moyenne on enregistre une diminution de 63 % par rapport aux observations du rythme cardiaque chez les témoins. Il ne semble pas que cette diminution soit progressive ou proportionnelle à une concentration en toxique mais qu'elle est plutôt stationnaire et essentielle à la définition de l'état comateux, elle apparaît plus comme un élément qualitatif de l'intoxication plutôt qu'une donnée évolutive, d'ailleurs aucun chiffre intermédiaire entre celui des témoins (54 battements par minute en moyenne en 1986) et celui des animaux comateux (21 battements/minute pour 0,6 mg/l et 0,8 mg/l confondus) n'est enregistré ce qui renforce le caractère subit de cette diminution. D'autre part, et bien que nous ayons noté deux états comateux bien distincts, la fréquence des battements cardiaques n'apparaît pas plus forte dans les cas de "coma léger" (à 0,6 mg/l) que dans les cas de "coma profond" (à 0,8 mg/l).

e) Evolution des poids individuels en cours d'expérimentation

Les pesées des civelles ont été obtenues (fig. 12) sur des animaux vivants en début d'expérimentation (pesée des 16 lots de 20 civelles), puis des animaux survivants en fin d'expérimentation et enfin des animaux morts en cours de test. Dans des conditions aussi différentes (individus vivants/individus morts/pesée de lot/pesée d'individu) il est évident qu'il ne s'agissait pas pour nous d'établir un calcul statistique mais plus simplement d'évaluer, de manière globale, l'évolution des animaux en cours de test. L'étude de la figure 10 permet les remarques suivantes :

. les pertes de poids, concernant les animaux vivants sont importantes après 21 jours d'expérience, ces pertes sont, pour partie, explicables par le fait que les animaux ne se nourrissent pas, mais il semble paradoxal de noter que les pertes les plus considérables (- 18,1 %) sont relevées chez les animaux témoins et que chez les civelles soumises à 0,2 et 0,4 mg/l de NP 5 l'amaigrissement est moins sensible (respectivement - 12,6 % et - 6,8 %) ; deux hypothèses probablement complémentaires se dégagent : d'une part la diminution d'activité chez les animaux exposés peut expliquer un plus faible métabolisme donc une économie énergétique et une perte de poids moins élevée, d'autre part il est probable que les mortalités relevés à 0,2 et 0,4 mg/l (respectivement 17,5 % et 12,5 %) ont frappé, d'abord, les animaux les plus faibles en poids (voir courbes 0,2 et 0,4 mg/l) cette sélection a pu permettre la survie des animaux les plus robustes, tandis que les animaux les plus maigres, non soumis à l'agression du polluant, survivent dans les bacs témoins et font chuter la moyenne "poids/individu" dans ces bacs.

. Pour les concentrations les plus faibles la pesée des animaux morts concordent avec la seconde hypothèse (surtout à 0,4 mg/l). Pour les concentrations plus élevées (0,6 et 0,8 mg/l) la soudaineté et l'intensité des effets toxiques touchent sans discernement de poids tous les animaux et masquent d'éventuelles différences de sensibilité entre individus.

f) Observations annexes

Les photos 3 et 4 nous permettent deux observations importantes. La civelle du haut est un animal tétanisé prélevé à 0,8 mg/l de NP 5 au 10ème jour d'exposition au toxique. La civelle du bas est un témoin prélevé au même jour et anesthésiée par le produit MS 222 (anesthésiant utilisé pour les animaux à sang froid : poissons, reptiles, batraciens....).

On peut noter chez la civelle exposée au toxique une hypertrophie du foie associée à une hypervascularisation et une hypertrophie du rein, ces deux organes étant fortement impliqués dans les phénomènes de détoxification (GRANMO - KOLLBERG, 1976).

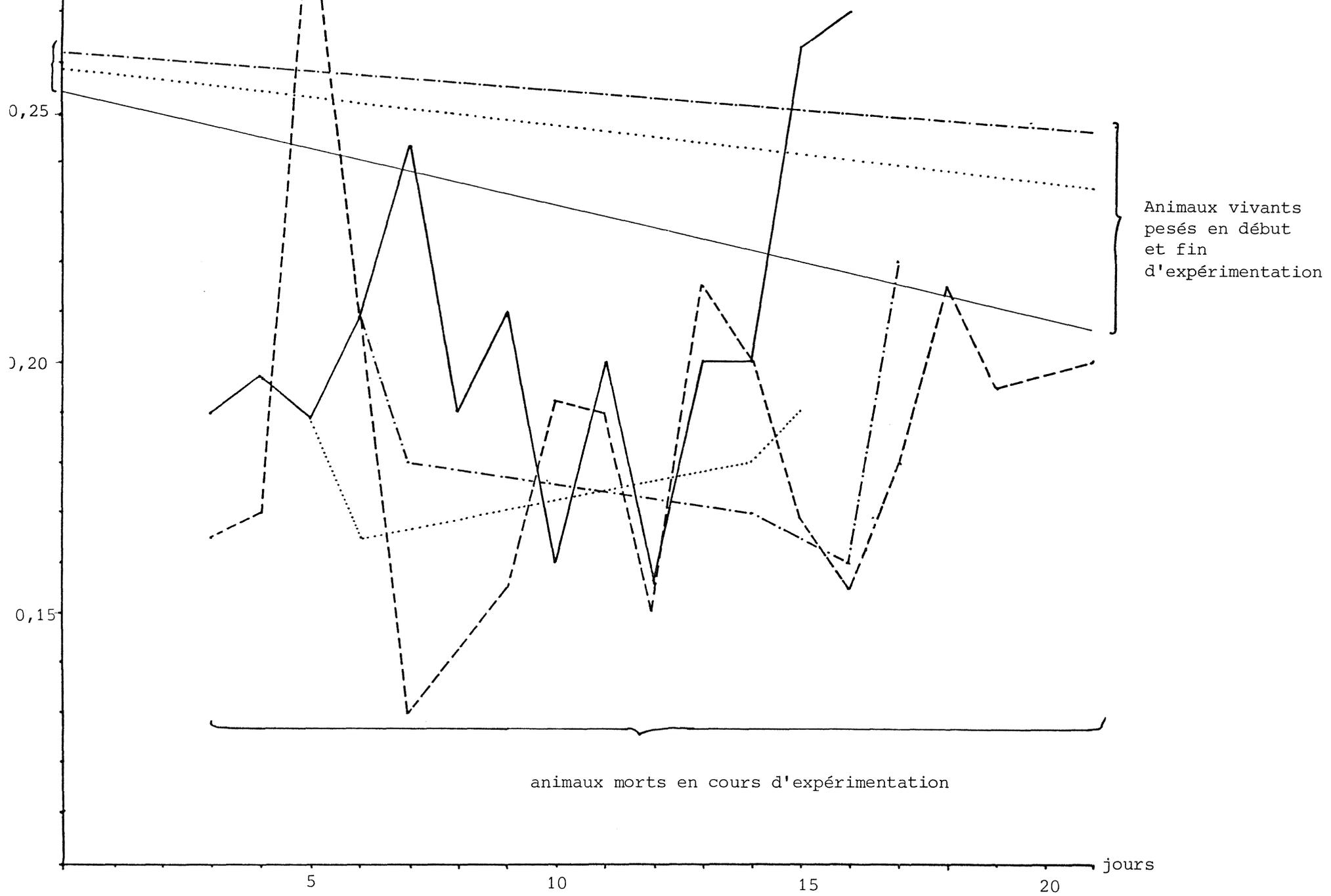
3°) Effets histologiques sur la branchie

La dernière partie de notre travail consiste en une étude anatomopathologique des branchies de civelles. Nous avons repris les principaux types d'observations histopathologiques qui avaient été utilisés dans un précédent travail (MIOSSEC, BOCQUENE, 1986) :

poids en gramme

- 0,8 mg/l
- - - 0,6 mg/l
- . - . 0,4 mg/l
- 0,2 mg/l
- témoins

Fig. 12 - Evolution des poids individuels



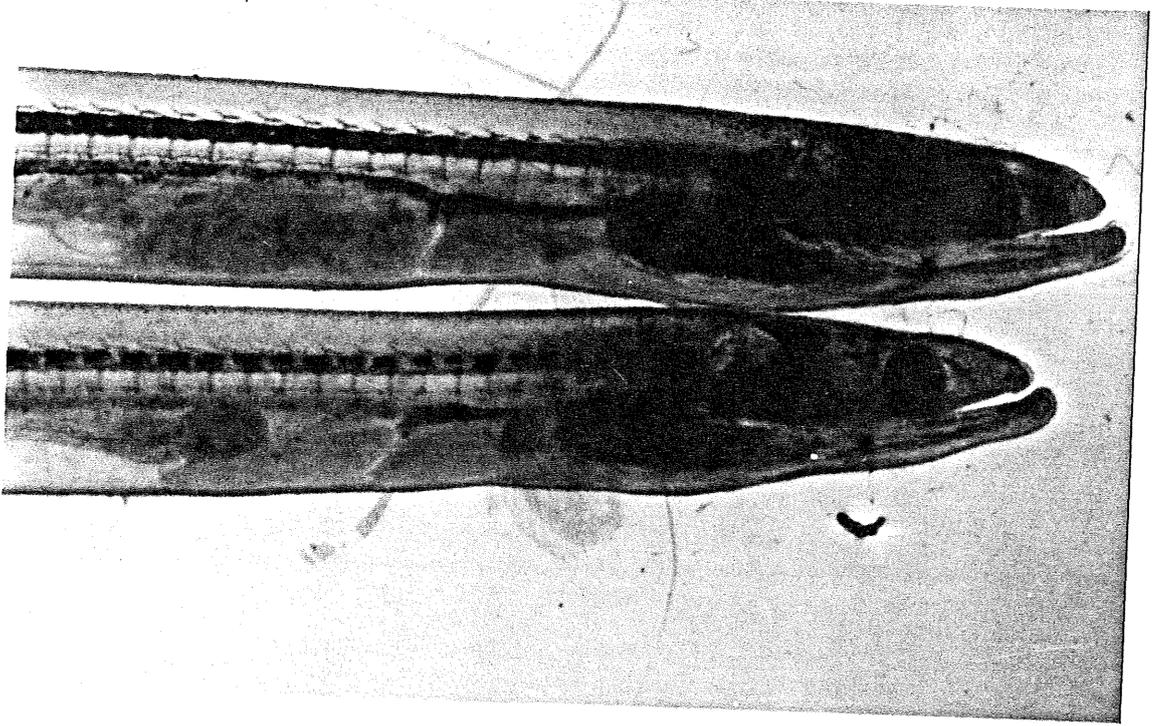


Photo 3 - Haut : 0,8 mg/l 10ème jour
Bas : civelle témoin (10ème jour) X 10

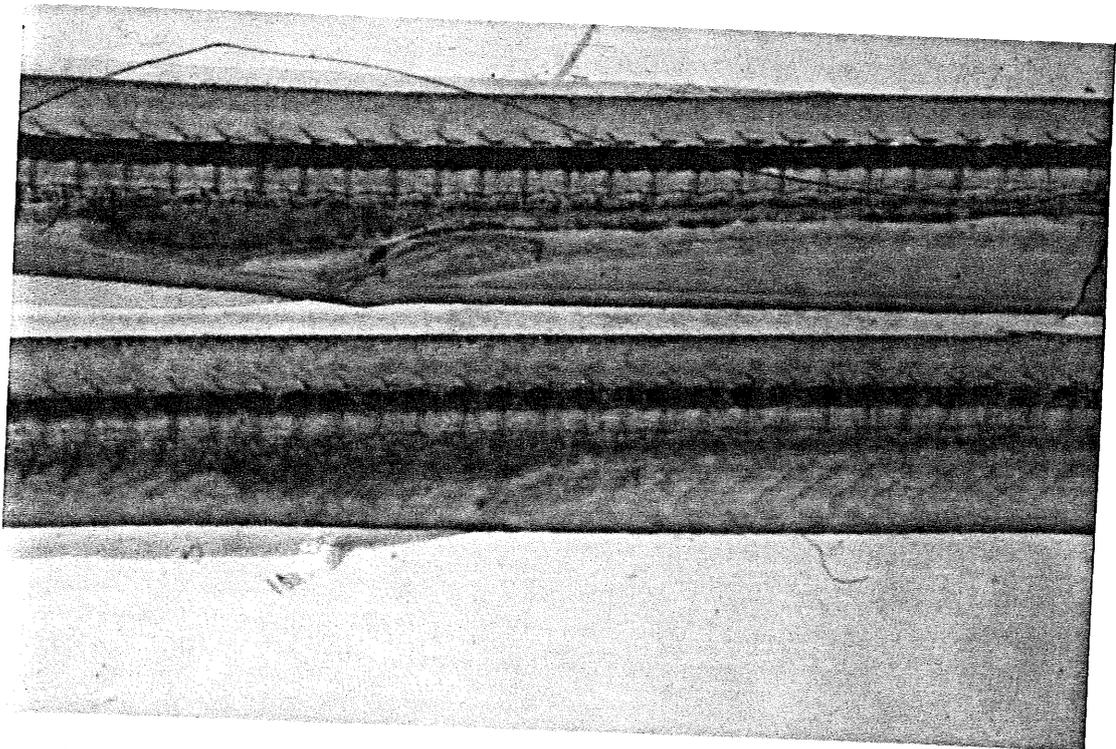


Photo 4 - Haut : 0,8 mg/l 10ème jour
Bas : civelle témoin X 10

- décollement de l'épithélium,
- fusion lamellaire,
- accumulation de cellules sanguines,
- présence de mucus autour des lamelles secondaires.

De plus, nous avons constaté des cas d'hypertrophie des cellules de l'épithélium des lamelles secondaires des individus soumis au polluant par rapport aux témoins (photo 5). Nous avons suivi l'apparition et l'évolution de ces types de lésions en fonction des concentrations d'une part, et du temps de contact d'autre part, puis pendant la phase de récupération. Les résultats sont présentés dans les tableaux 11 et 12. Certaines lésions présentent une fréquence marquée, d'autres apparaissent plus occasionnelles. Ainsi en est-il des phénomènes de décollement de l'épithélium et de fusion lamellaire : on note au 6ème jour d'exposition des cas de décollement de l'épithélium des lamelles secondaires à 0,2 et 0,4 mg/l, ainsi qu'au 9ème jour, à 0,2 et 0,8 mg/l, de façon plus marquée. Par la suite, cette observation n'a plus été enregistrée. Certaines lamelles secondaires apparaissent fusionner, le phénomène est rare cependant, et en général constaté sur un seul des deux individus traités ; il apparaît de façon aléatoire par rapport au temps d'exposition et aux concentrations.

La coloration topographique utilisée (PAS - bleu alcyan - Van Gieson) permet de mettre en évidence les sécrétions de mucus. On constate ainsi, la présence d'une couche de mucus soit bordant les lamelles primaires soit recouvrant tout ou partie de l'épithélium des lamelles secondaires aux autres conditions expérimentales. Le phénomène est important au début de l'expérimentation surtout aux faibles concentrations et s'atténue avec le temps puisqu'il n'est sensible au 19ème jour d'exposition qu'à 0,2 mg/l (photos 6, 7 et 8). De même il est observable uniquement à 0,4 mg/l pendant la phase de récupération (13ème jour de récupération). Notons toutefois, que la présence de mucus est également remarquable chez les témoins tout au long de l'expérience.

Nous avons constaté, lors d'une étude de toxicité aiguë des nonylphénols polyéthoxylés (MIOSSEC et BOCQUENE, 1986) la prolifération de cellules sanguines dans les canaux sanguins, l'intensité de ce processus pathologique était proportionnelle à la toxicité du tensio-actif. Nous retrouvons ici ce type de perturbation vasculaire. Limité au début de l'exposition aux fortes concentrations (0,6 et 0,8 mg/l), il tend à se généraliser avec le temps à toutes les teneurs et persiste avec la même intensité en phase de récupération (photos 8, 11 et 12).

Un dernier type de lésions tissulaires branchiales apparaît pendant la période d'exposition, il s'agit d'hypertrophie des cellules de l'épithélium des lamelles secondaires. Celle-ci se développe à partir du 14ème jour d'exposition, d'abord à 0,6 et 0,8 mg/l puis aux faibles concentrations (photos 9 et 10). Cette pathologie persiste en phase de récupération, atténuée toutefois et limitée aux individus soumis initialement à 0,2 mg/l. On peut remarquer qu'au 19ème jour d'exposition une des deux civelles témoins présente des lésions branchiales comparables à celles des animaux traités. Il est possible que cette pathologie soit imputable à des conditions de stress avant ou au moment de sa capture.

Photo 5 - Civelle témoin J 34 (récupération) (X 1250)

SV sinus veineux central
EP épithélium
HE hématies
VSA vaisseau sanguin afférent
VSE vaisseau sanguin efférent
C cartilage

Photo 6 - Civelle exposée au NP 5 - 0,2 mg/l J 6 (exposition) (X 1250)

(►) importance du mucus (MU)

Photo 7 - Civelle exposée au NP 5 - 0,8 mg/l J 9 (exposition) (X 1250)

(►) importance du mucus (MU)

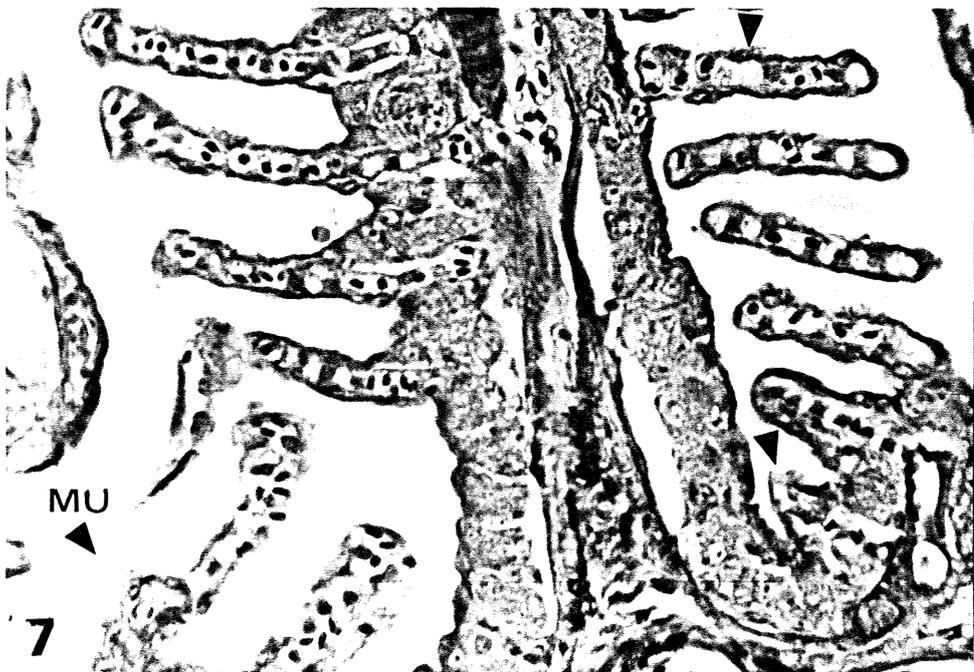
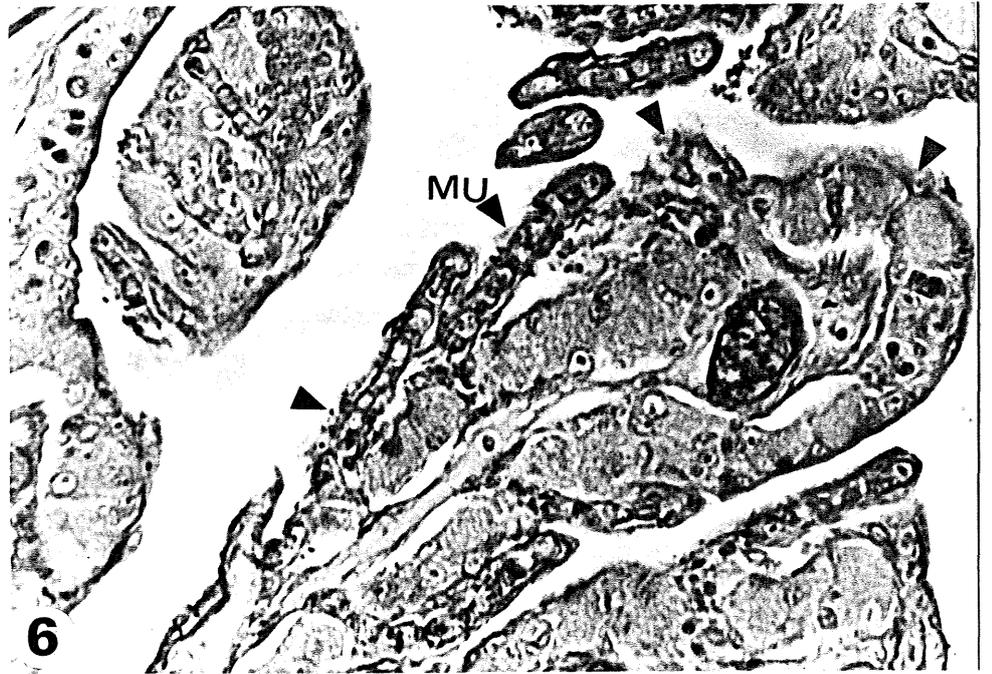
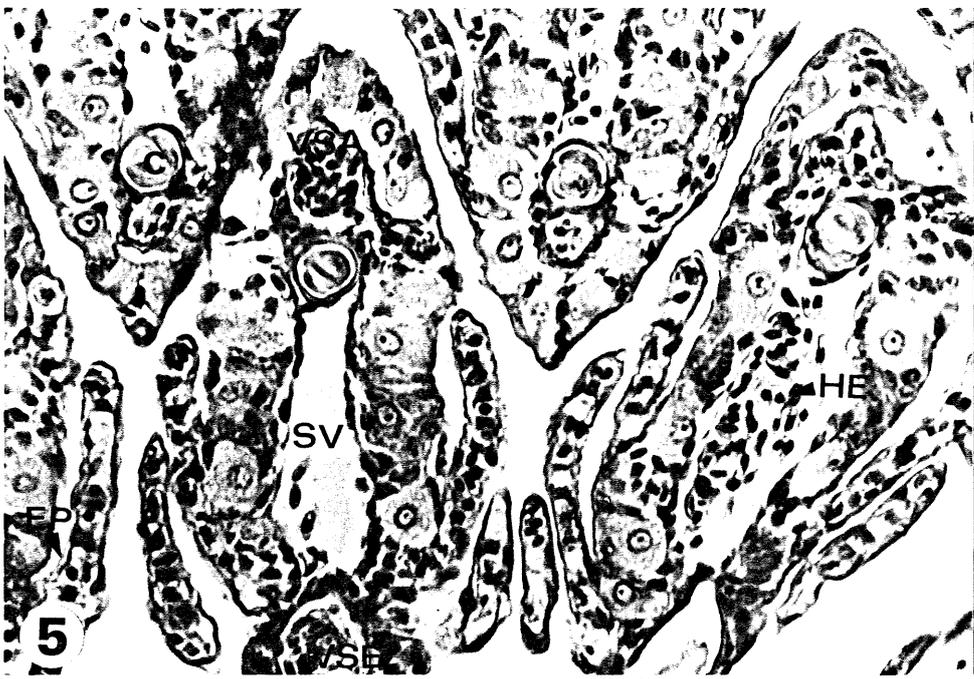


Photo 8 - Civelle exposée au NP 5 - 0,2 mg/l J 14 (exposition) (X 1250)

- importance du mucus (MU ►)
- hypertrophie de l'épithélium (EP) des lamelles secondaires (►)
- prolifération de cellules sanguines (HE ►)

Photo 9 - Civelle exposée au NP 5 - 0,6 mg/l J 14 (exposition) (X 1250)

Hypertrophie de l'épithélium (EP) des lamelles secondaires (►)

Photo 10 - Civelle exposée au NP 5 - 0,8 mg/l J 14 (exposition) (X 1250)

Hypertrophie de l'épithélium (EP) des lamelles secondaires (►)

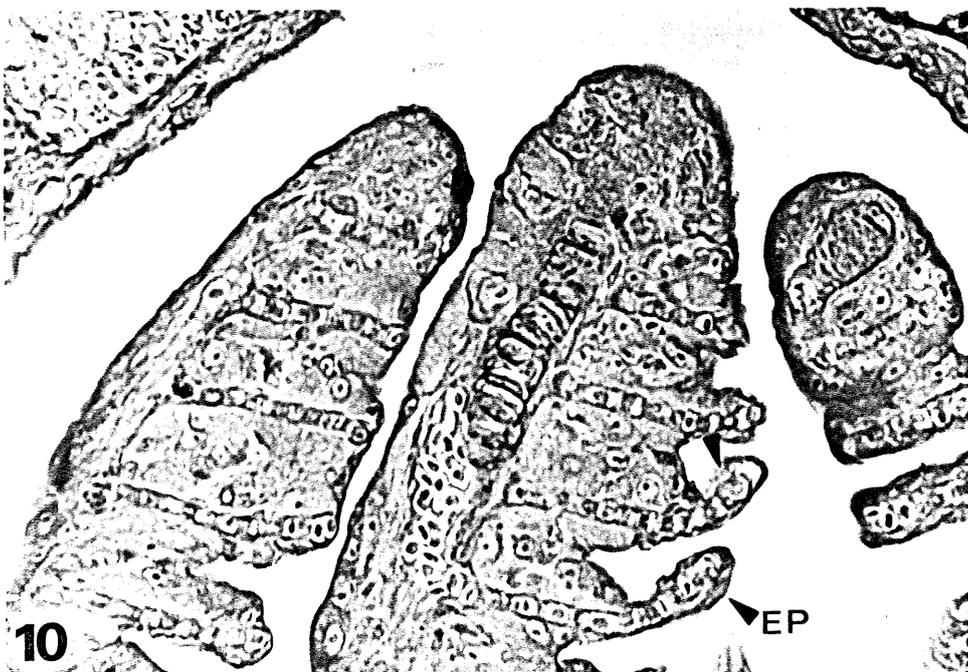
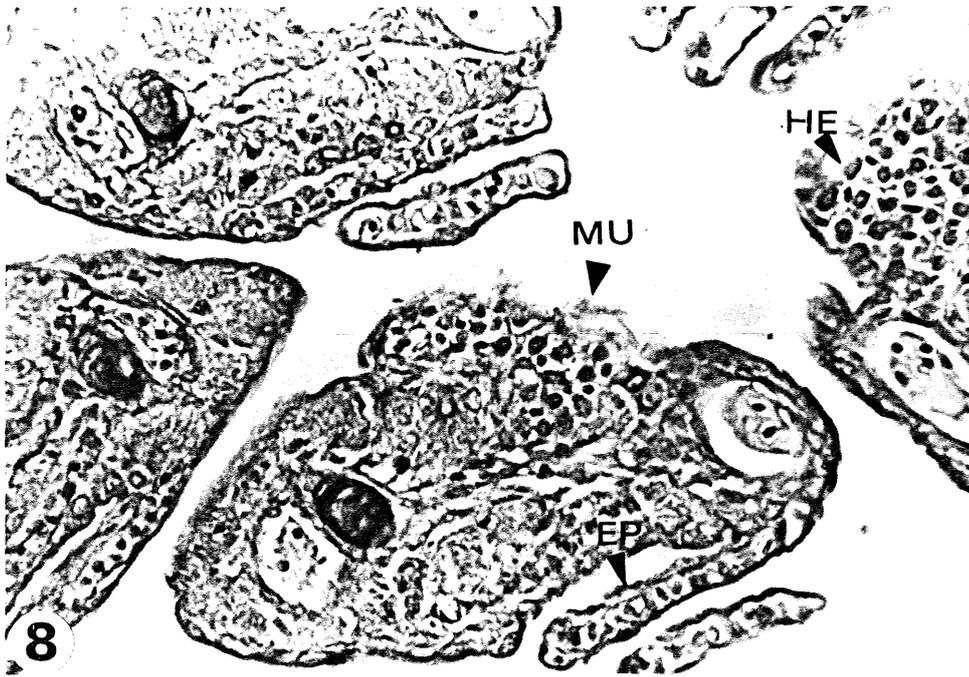
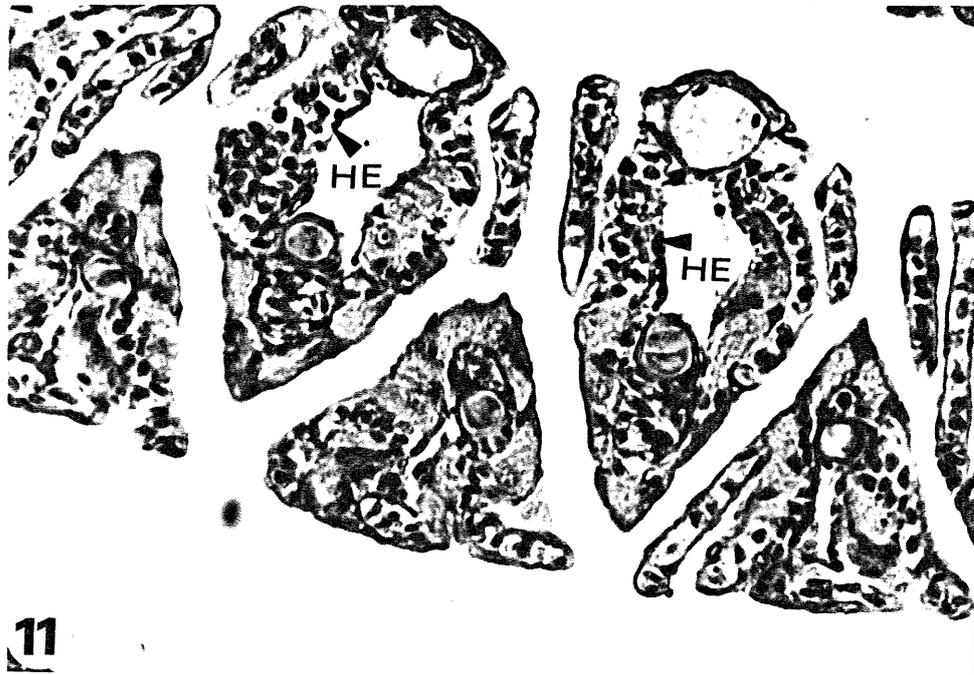


Photo 11 - Civelle exposée au NP 5 - 0,2 mg/l J 34 (récupération) (X 1250)
Prolifération de cellules sanguines (HE ►)

Photo 12 - Civelle exposée au NP 5 - 0,4 mg/l J 34 (récupération) (X 1250)
Prolifération de cellules sanguines (HE ►)



11



12

Conditions expérimentales	Nbre de civ.	Décollement de l'épithélium	Hypertrophie des cellules de l'épithé.	Fusion lamel-laïre	Accumulation de cellules sanguines	Présence de mucus autour des lamelles II
J 6						
témoin	2	-	-	-	-	+ sur L I
0,2 mg/l	2	+	-	-	-	+ + +
0,4 mg/l	2	+	-	-	-	+
0,6 mg/l	1	-	-	-	+ +	+
0,8 mg/l	2	-	-	+	+ +	+
J 9						
témoin	2	-	-	-	+	+ +
0,2 mg/l	2	+ +	-	+	-	+ + +
0,4 mg/l	2	-	-	+	+ +	-
0,6 mg/l	2	-	-	-	+	-
0,8 mg/l	2	+ +	-	-	+ +	-
J 14						
témoin	1	-	-	-	-	-
0,2 mg/l	2	-	-	-	+ +	+ + +
0,4 mg/l	2	-	-	+	+ +	+ +
0,6 mg/l	2	-	+ +	-	+ +	+
0,8 mg/l	2	-	+ +	-	+ +	-
J 19						
témoin *	2	-	+	-	+	+
0,2 mg/l	2	-	+ +	-	+ +	+
0,4 mg/l	2	-	-	-	+	-
0,6 mg/l	2	-	+ +	-	+ +	-

Tableau 11. - Fréquence des observations histopathologiques sur les branchies de civelles soumises au NP 5 à différentes concentrations pendant 21 jours (la présence et l'intensité des phénomènes observés ont été schématisées par des croix).

J = jour

Lamelles II = lamelles secondaires

(* ces lésions branchiales n'ont été observées que sur un seul des 2 témoins).

Conditions expérimentales	Nbre de civ.	Décollement de l'épithélium	Hypertrophie des cellules de l'épithé.	Fusion lamel-laïre	Accumulation de cellules sanguines	Présence de mucus autour des lamelles II
<u>R + 5 jours</u>						
0,2 mg/l	2	-	+	-	-	-
0,4 mg/l	2	-	+	-	+	-
<u>R + 8 jours</u>						
témoin	2	-	-	-	-	-
0,2 mg/l	2	-	+	-	++	-
0,4 mg/l	2	-	-	-	++	-
<u>R + 13 jours</u>						
témoin	2	-	-	-	-	++
0,2 mg/l	2	-	+	-	++	-
0,4 mg/l	2	-	-	-	+	+

Tableau 12. - Fréquence des observations histopathologiques sur les branchies de civelles après exposition au NP 5 à 0,2 et 0,4 mg/l pendant 21 jours : période de récupération. (la présence et l'intensité des phénomènes observés ont été schématisées par des croix).

R = récupération

Lamelles II = lamelles secondaires

En résumé, les branchies de civelles soumises au NP 5 à différentes concentrations réagissent très vite au polluant par des sécrétions de mucus fortes au départ, plus rares par la suite aux teneurs élevées. Différentes pathologies se développent en fonction du temps de contact, certaines sont quantitativement importantes et évolutives : congestion vasculaire, hypertrophie cellulaire. D'abord limitées aux fortes concentrations, elles tendent à se généraliser.

Sur les animaux replacés en eau propre après exposition à 0.2 et 0.4 mg/l les types dominants de lésion se retrouvent, atténués toutefois, signe d'une "récupération" des tissus.

IV - DISCUSSION

Les effets sublétaux

De l'ensemble des données sublétales il ressort trois observations essentielles :

- l'importance de l'effet comateux,
- une plus faible toxicité du polluant dans les bacs "comportement",
- une destruction plus ou moins importante des tissus branchiaux.

1°) L'effet comateux

L'effet sublétaux prédominant dans cette étude est l'effet comateux du toxique. Outre son aspect spectaculaire et subit, l'effet comateux et la diminution du rythme cardiaque qui l'accompagne, sont les caractères essentiels de l'intoxication dans le comportement de l'animal.

Dans une étude comparative des effets de plusieurs types de tensio-actifs SWEDMARK et al. (1971) décrivent la progression de l'intoxication sur plusieurs espèces marines. Chez le poisson (Gadus morrhua) la première réaction aux tensio-actifs est une augmentation d'activité que les auteurs attribuent à un réflexe de fuite devant l'effet délétère du polluant. Cette période d'excitation est suivie d'un arrêt de la nage puis d'une phase d'immobilisation qui peut aboutir à la mort. Les effets sur la nage et les mouvements respiratoires sont les suivants : augmentation d'activité suivie d'une atteinte du sens de l'équilibre suivie elle-même d'une immobilisation totale. Dans le cas précis du NP 10 à 2.5 mg/l, l'activité du poisson est marquée par une brève phase d'excitation ; dans la période suivante l'animal perd le sens de l'équilibre et présente peu à peu les symptômes du coma avec diminution considérable des rythmes cardiaques et respiratoires. Cette description de l'état clinique de l'intoxication correspond à nos observations lors de cette étude bien que nous n'ayons pas noté la phase d'excitation chez la civelle, mais l'extrême vivacité de cet animal a pu masquer cette période brève. La phase comateuse est relevée par plusieurs auteurs, WILDISH (1972) travaillant sur Gammarus oceanicus note "un état moribond durable" en présence de tensio-actifs non ioniques en précisant le caractère réversible de l'intoxication semblable à un effet anesthésiant, il lui est "impossible de déterminer le temps de survie du crustacé tant l'animal présente un état

moribond sans toutefois mourir avant un certain temps". Toujours selon WILDISH (1973) dans une autre étude, les mécanismes toxiques des composés polyéthoxylés peuvent impliquer un blocage du système nerveux central dû à l'affinité du toxique pour les lipoprotéines des membranes cellulaires. GLAVE et CORWIN (1972) ajoutent que cette toxicité dépendrait étroitement des coefficients de partage eau/solvant organique au niveau cellulaire, comme c'est le cas avec les produits anesthésiants. La toxicité des tensio-actifs non ioniques à faible chaîne polyéthoxylé (du type NP 5) serait essentiellement due à leur forte solubilité dans les graisses qui aboutirait à une pénétration plus fortes dans les cellules (WILDISH, 1974), PRAT et GIRAUD (1964) précisent que les tensio-actifs non ioniques pénètrent plus facilement les cellules en créant moins de lésions que les produits anioniques. Les travaux de GLOXHUBER et FISCHER (1968) ceux de CALAMANI et MARCHETTI (1973) ainsi que les observations de SWEDMARK et al. (1971) suggèrent une action narcotique des tensio-actifs non ioniques. Dans des travaux portant sur l'influence des variations de salinité sur le rythme cardiaque de la civelle, LHOTTE (1945) note l'action particulière de l'ion Cl sur les modifications du rythme cardiaque et affirme que la diminution de ce rythme est "pro parte d'ordre nerveux".

De notre côté nous avons constaté une similitude entre l'attitude des animaux comateux soumis au NP 5 (0,6 et 0,8 mg/l) et l'aspect de civelles saines anesthésiées au MS 222, anesthésique destiné aux animaux poikilothermes (photo n° 2).

Le produit MS 222 des laboratoires SANDOZ est aussi appelé Tricaine ou Métacaine ; c'est un éthyl m-aminobenzoate méthanesulfonate (la partie sulfonate de la molécule lui confère des propriétés tensio-actives).

Il apparaît donc une forte analogie entre les effets sublétaux du NP 5 sur le comportement animal et les effets anesthésiants : aspect tétanisé de l'animal, coma avec diminution extrême des fonctions cardiaques et respiratoires, enfin le caractère réversible des effets (selon la concentration en toxique et la durée d'exposition à celui-ci), réversibilité notée par plusieurs auteurs (WILDISH - SWEDMARK) et que nous avons observé dans des travaux précédents (MIOSSEC, BOCQUENE, 1986). Cette similitude dans les effets semble nous orienter vers une atteinte importante du système nerveux central, sans pour autant exclure d'autres sites sensibles (branchies - foie - rein - vessie natatoire). Cependant, entre la complexité des structures biochimiques des divers constituants nerveux, les interactions encore mal connues des médiateurs synaptiques, les déséquilibres ioniques membranaires, il est prématuré de prioriser un mécanisme d'action particulier du tensio-actif, peu de données précises étant actuellement disponibles. Seuls ont été abordés, à notre connaissance, le caractère liposoluble des nonylphénols faiblement éthoxylés qui facilite leur pénétration cellulaire, et leurs propriétés tensio-actives modifiant la tension superficielle cellulaire.

2°) Influence du tube nidificateur sur l'effet toxique

Nous avons abordé dans le paragraphe présentant les résultats, le ralentissement des effets sublétaux dans les bacs "comportement" où nous avons introduit un double élément nidificateur.

Cette diminution des effets toxiques du NP 5 est importante puisque pour une concentration en toxique de 0,8 mg/l, la LT 50 qui est de 16 jours dans le bac contenant le tube nidificateur (bac "comportement") est ramené à 8 jours dans le bac nu (bac "toxicité") ; pour la concentration plus faible de 0,6 mg/l la LT 50 passe de 21 jours (bac "comportement") à 12 jours (bac "toxicité").

Nous avons vu que - à concentration égale - le comportement des civelles est radicalement différent dans les deux séries. Si l'animal explore sans cesse le bac nu, il en est autrement pour les animaux introduits dans les bacs "comportement" qui occupent rapidement le tube refuge, en se groupant. L'attitude de l'animal nidifié a été décrite précédemment. De toute évidence les animaux ainsi nidifiés présentent un métabolisme ralenti lié à leur inaction par comparaison aux civelles introduites dans les bacs "toxicité" qui nagent activement. L'interprétation des figures 8 et 9 montrant l'évolution du pourcentage d'animaux actifs (nageants), chez les témoins, montre que sur l'ensemble des 21 jours de l'expérimentation, la majorité des animaux témoins du bac "comportement" est nidifiée : entre 85 et 100 % des individus, tandis qu'un pourcentage important des animaux du bac "toxicité" (jusqu'à 40 %) présente un maximum d'activité (si l'on admet que parmi les paramètres retenus, la nage est assimilable à un maximum dans l'activité du poisson).

Il semble donc, à partir de ces observations comportementales et des résultats de mortalité que les animaux testés dans les bacs "toxicité" en augmentant leur métabolisme augmentent aussi les échanges avec le milieu et la pénétration du toxique dans l'organisme.

Un second point important mérite d'être développé, que nous avons aussi abordé dans la présentation des résultats. Nous savons que l'activité essentiellement nocturne de la civelle cesse avec le jour, que les animaux adoptent une attitude de repos dans les refuges qu'offre le sédiment et que ce comportement revêt un aspect grégaire (LECOMTE -FINIGER, 1983).

Nous pouvons penser que l'introduction des civelles dans les bacs comprenant des tubes nidificateurs reproduit, pour partie, un comportement plus proche de celui qu'à l'animal dans le milieu naturel et que dans ces conditions meilleures les animaux exposés au toxique sont moins sensibles aux stress de l'expérimentation et de ce fait moins sensibles à l'agression de l'agent polluant. Il semble probable, en effet, que les conditions d'intoxication in vitro, sont plus défavorables pour l'animal que celles rencontrées dans le milieu et que l'association des effets de stress et des effets toxiques soit synergique par effet additif.

Il semble donc que la conjonction de ces deux paramètres, baisse d'activité et conditions de milieu plus favorables, diminue considérablement la vulnérabilité de l'animal aux effets délétères des substances xénobiotiques.

3°) Histologie des branchies

Les données bibliographiques mettent en évidence les effets toxiques induits par les détergents sur les tissus branchiaux (BROWN et al., 1968 - ABEL, 1974). Les auteurs observent un décollement et un épaississement de l'épithélium des lamelles secondaires, des soudures de lamelles entre elles etc.

Nos observations histopathologiques sont du même ordre. Il s'agit, principalement, d'hypertrophie cellulaire de l'épithélium des lamelles secondaires et d'accumulation de cellules sanguines dans les vaisseaux sanguins. Ces lésions, d'abord limitées aux plus fortes concentrations, se développent également sur les branchies des civelles soumises à 0,2 et 0,4 mg/l. Cependant, cette pathologie ne semble pas irréversible puisqu'on constate une moindre atteinte des tissus en période de récupération. De plus, les branchies réagissent très vite à la présence de détergent dans l'eau en secrétant du mucus, barrière physique et biologique à la pénétration du polluant dans l'organisme. Cette protection n'est plus observable en fin d'exposition à fortes concentrations. Ceci peut être dû à un épuisement des cellules sécrétrices, phénomène déjà observé lors de l'étude de la toxicité aiguë de plusieurs nonylphénols polyéthoxylés (MIOSSEC et BOCQUENE, 1986).

Les branchies sont les premiers organes à être en contact intime avec le milieu extérieur. Comme ils sont le site de plusieurs fonctions vitales (respiration, excrétion, osmorégulation), l'altération des tissus peut avoir des conséquences non négligeables sur ces fonctions. Une controverse existe au sujet du mécanisme d'action des tensio-actifs sur les poissons. Certains auteurs comme BOCK (1967) pensent que les destructions des tissus branchiaux sont causées par une réduction des tensions superficielles, donc imputables aux propriétés physiques de ces polluants. Par contre, MÜLLER (1980), testant les effets létaux d'un nonylphénol éthoxylé en présence d'agents anti-moussants, a constaté que la baisse de tension de surface qui en résulte n'augmente pas pour autant la toxicité. Reprenant l'hypothèse de MARCHETTI (1965), puis de GRANMO et KOLLBERG (1976), il conclut plutôt à la toxicité chimique de ces produits. Les tensio-actifs sont connus pour se fixer sur les membranes cellulaires, du fait de leur caractère lipophile. Se combinant aux lipides et aux problèmes membranaires à fortes concentrations ils le dénaturent. Ces changements structuraux, par une augmentation de la taille et/ou du nombre de pores membranaires, peuvent être la cause de l'augmentation de la perméabilité membranaire enregistrée après exposition à des détergents (JACKON et FROMM, 1977). BOLIS et RANKIN (1980) puis STAGG et al. (1981) ont montré, de plus, que des détergents anioniques interféraient avec la noradrénaline au niveau branchial. L'adrénaline et la noradrénaline sont des catécholamines hormonales secrétées en quantité sous l'effet d'un stress. Ces substances augmentent la diffusion de l'eau chez des poissons d'eau douce, la diminuent chez les espèces marines (MAZEAUD et al., 1977). Les détergents se fixeraient sur les récepteurs β -adrénergiques situés entre les artères branchiales afférentes et efférentes, sites d'action de l'adrénaline, modifiant ainsi son action (BOLIS et RANKIN, 1980). Le résultat de cette interférence sur les espèces marines est de nouveau une augmentation de la perméabilité membranaire. Cette modification a pour conséquence au niveau des capillaires sanguins une exsuviation de liquide et une congestion de cellules sanguines dans les canaux (MALLATT, 1985), phénomène que nous avons observé au cours de notre expérience.

La branchie apparaît, de ce fait, comme une des voies privilégiées de pénétration des polluants dans l'organisme. Ceci a été mis en évidence par GRANMO et KOLLBERG (1976). Travaillant sur la morue, Gadus morrhua, ils ont montré que le nonylphénol polyéthoxylé NP 10 pénétrait préférentiellement par les branchies, puis transporté par le sang il transitait par le foie avant d'être stocké dans la vésicule biliaire puis éliminé par les voies urinaires. L'assimilation de détergents se fait également par le tube digestif, plus faiblement cependant. Ils constatent que ces organes s'épurent très rapidement si les animaux sont replacés en eau dénuée de polluant.

Cependant, il semble erroné de penser que la branchie constitue l'organe-cible des détergents. Du fait de leur action au niveau membranaire ils touchent également les organes sensoriels. CHATTOPADHYAY et KONAR en 1984 ont, en effet, montré qu'un détergent anionique éthoxylate diminuait la quantité de nourriture assimilée par le tilapia et réduisait son index de maturité sans pour autant limiter sa fécondité. Ces modifications de comportement ainsi que celles, liées à la nage, constatées chez le poisson Cirrhina mrigala par MISRA et al. (1985) peuvent être imputées à la fois à des dysfonctionnements des fonctions de respiration et d'osmorégulation, mais également aux irritations des muqueuses olfactives induites par les détergents (CANCALON, 1980).

V - CONCLUSIONS

Faisant suite à nos travaux sur la toxicité de différents nonylphénols polyéthoxylés (MIOSSEC, BOCQUENE, 1986), cette étude constitue une seconde étape dans la compréhension des mécanismes d'action de ces tensio-actifs. Elle a été conduite sur la civelle pendant trois semaines à des concentrations inférieures à la CL 50 du NP 5 (1,2 mg/l). La teneur la plus basse testée (0,2 mg/l) s'est révélée toxique, elle correspond à des concentrations en nonylphénols, dosées dans un effluent urbain après épuration (STEPHANOU et GIGER, 1982). Les effets sublétaux enregistrés sont d'ordre physiologique et comportemental : diminution des activités cardiaques et respiratoires, de la mobilité, perte des réflexes de fuite et de nidification. De même, des modifications anatomopathologiques observées sur les branchies il résulte, à l'évidence, une perturbation de la respiration. La bibliographie récente tend à limiter voire éliminer l'importance des propriétés physiques des détergents (réduction des tensions superficielles) dans les effets toxiques observés. Leurs propriétés chimiques seraient davantage impliquées. Il semble, en effet, acquis que le caractère très liposoluble de la molécule entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire. Nous avons rassemblé dans la figure 13 nos résultats et les données de la bibliographie. Le schéma obtenu cherche à approcher le mécanisme d'action des détergents sur le poisson. Il montre que les incidences locales constatées au niveau branchial ont des répercussions sur l'ensemble du métabolisme de la civelle. La branchie apparaît ici comme l'organe pivot de l'intoxication. L'impact au niveau des systèmes nerveux et sensoriel mérite par contre un complément d'étude.

Notre travail établit le caractère toxique des nonylphénols, tensio-actifs utilisés notamment dans le traitement des nappes d'hydrocarbures en mer. Cette toxicité crée un risque potentiel non négligeable vis-à-vis des espèces marines, car les nonylphénols peu ou pas éthoxylés sont connus pour être difficilement biodégradables.

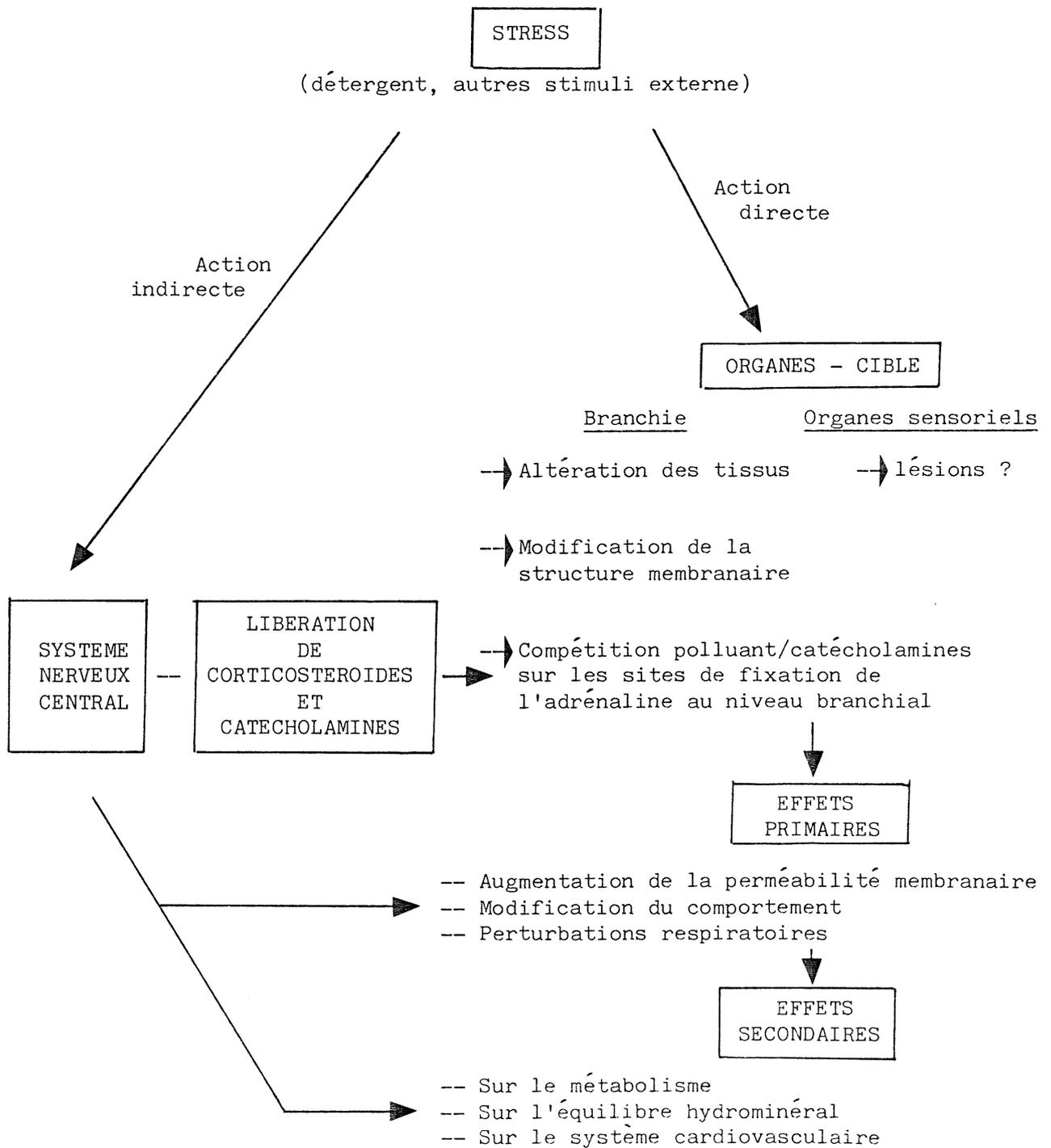


Figure 13.- Schéma du mécanisme d'action potentiel des détergents sur le poisson

BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME, 1979** - Manual of methods in aquatic environment research - Part 5 Statistical tests. FAO - Fisheries Technical Paper n° 182.
- ABEL (P.D.), 1974** - Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. J. Fish. Biol. 6 : 279 - 298.
- BLANCHETEAU (M.), 1972** - L'ondulation natatoire chez l'anguille (Anguilla-anguilla) spinale. Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle, 3eme serie, n° 80.
- BLISS (C.I.), 1938** - The determination of the dosage mortality curve from small numbers. Quart. J. Pharm. 11, 192 - 216.
- BOCK (K.J.), 1967** - Uber die Wirkung der Grenz flachenaktivität auf Fische. Mûchn, Beitr. Abwasser Fisch Flussbiol, 9, 110 - 117.
- BOLIS (L.), RANKIN (J.C.), 1980** - Interactions between vascular actions of detergent and catecholamines in perfused gills of European eel, Anguilla anguilla L, and brown trout, Salmo trutta L. J. Fish. Biol. 16, 61-73.
- BROWN (V.M.), MITROVIC (V.V.), STARK (G.T.C.), 1968** - Effects of chronic exposure to zinc on toxicity of a mixture of detergent and zinc. Water Research 2 : 225 - 263.
- CANCALON (P.), 1980** - Effects of salts pH and detergents on the catfish olfactory mucosa. In olfaction and taste (M. Vauder Starre, ed.) Vol. 8, 73 - 76. IRL Press, London, In Misra et al. (1985).
- CHATTOPADHYAY (D.N.), KONAR (S.K.), 1984** - Influence of an anionic detergent on fish. Environment and ecology, vol. 2, n° 4, pp. 257 - 261.
- ELIE (P.), 1979** - Contribution à l'étude des montées de civelles d'Anguilla anguilla L. dans l'estuaire de la Loire : pêche, écologie, écophysologie et élevage. Thèse de 3ème cycle 381 p.
- GEORGE (J.D.), 1970** - Sublethal effects on living organisms. Marine Poll. Bull. 1 (7).
- GRANMO (A.), JORGENSEN (G.), 1975** - Effets on fertilization and development of the common mussel Mytilus edulis after long term exposure to a nonionic surfactant. Marine Biology, 33, 17 - 20.
- GRANMO (A), KOLLBERG (S), 1976** - Uptake pathways and elimination of a nonionic surfactant in cod, Gadus morrhua L. Water Research. vol. 10, 189 - 194.
- JACKSON (W.F.), FROMM (P.O.), 1977** - Effect of a detergent on flux of tritiated water into isolated perfused gills of rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. vol. 58 c - 167 - 171.

- LECOMTE-FINIGER (R.)**, 1978 - Contribution à l'étude biologique et écologique des civelles (Anguilla anguilla) entrant dans un étang méditerranéen. Thèse Université Paris VIe, 66 p.
- LECOMTE-FINIGER (R.)**, 1983 - Contribution à la connaissance de l'écobiologie de l'anguille (Anguilla anguilla) des milieux lagunaires méditerranéens du golfe du Lion : Narbonnais et Roussillon. Thèse d'Etat, Univ. Perpignan, 203 p.
- LHOTTE (R.)**, 1945 - Influence des variations de salinité sur le rythme cardiaque de la jeune anguille. C. R. des Séances de la Sté de Biologie, 139, 27-28.
- LINDEN (O.)**, 1974 - Effects of oil spills dispersants on the early development of the Baltic Herring. Ann. Zool. Fennici 11, 141-148.
- MALLAT (J.)**, 1985 - Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 42 : 630-648.
- MACEK (K.J.)**, **KRZEMINSKI (S.F.)**, 1975 - Susceptibility of Bluegill sunfish (Lepomis macrochirus) to nonionic surfactants. Bull. of Envir. Contam. and Toxicology. Vol. 13, n° 3.
- MARCHETTI (R.)**, 1965 - Revue critique des effets des détergents synthétiques sur la vie aquatique. Stud. Rev. Gen. Fish. Coun. Medit (Fr), 26 : 30.
- MAZEAUD (M.M.)**, **MAZEAUD (F.)** and **DONALDSON (E.M.)**, 1977 - Primary and secondary effects of stress in fish : Some new data with a general review. Trans. Am. Fish. Soc. Vol. 106, n° 3, 201-212.
- MIOSSEC (L.)**, **BOCQUENE (G.)**, 1986 - Toxicité aiguë et effets sublétaux après une courte exposition de différents nonylphénols polyéthoxylés sur la civelle. Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 48 (1 et 2), 77-84.
- MISRA (V.)**, **LAL (M.)** **CHAWLA (G.)**, **VISWANATHAN (P.N.)**, 1985 - Pathomorphological changes in gills of fish fingerlings (Cirrhina mrigala) by linear alkyl benzene sulfonate. Ecotoxicology and environment safety. 10, 302-308.
- MOHR (H.)**, 1970 - Aktivitäts periodik bei Aalen. Inf. Fischw. Auslds. 17, 105-107.
- MULLER (R.)**, 1980 - Fish toxicity and surface tension of nonionic surfactants : investigation of antifoam agents. J. Fish. Biol., 16. 585-589.
- PRAT (R.)**, **GIRAUD (A.)** - The Pollutions of water by detergents. OCDE (Paris), Publ. n° 16601.
- RICHARD (A.)**, 1955 - La locomotion et son inhibition chez l'anguille. J. Physiologie, 47, 807-817.
- SAGLIO (P.)**, 1982 - Piégeage d'anguilles (Anguilla anguilla) dans le milieu naturel. Mise en évidence de l'attractivité phéromonale du mucus épidermique. Acta Oecologica. Oecol. Applic. 3 (3), 223-231.

STAGG (R.M.), RANKIN (J.C.), BOLIS (L.), 1981 - Effect of detergent on vascular responses to noradrenaline in isolated perfused gills of the eel, Anguilla anguilla L. Environmental Pollution (séries A), 24, 31-37.

SWEDMARK (M.), BRAATEN (B.), EMANUELSSON (E.) et GRANMO (A), 1971 - Biological effects of surface active agents on marine animals. Marine Biology, 9, 183-201.

TESCH (F.W.), 1977 - The eel, biology and management of anguilled eels. Chapman and Hall edit. 1977.

WILDISH (D.J.), 1972 - Acute toxicity of polyoxyethylene esters and polyoxyethylene ethers to S. salar and G. oceanicus. Water Research, vol. 6, 759-762.

WILDISH (D.J.), 1973 - Lethal response by atlantic salmon parr to some polyoxyethylated cationic and nonionic surfactants. Water Research, vol. 8, 433-437.

WILDISH (D.J.), 1974 - Arrestant effects of polyoxyethylene esters on swimming in the winter flounder. Water Research, vol. 8, 579-583.

WILSON (D.P.), 1968 - Long term effects of low concentrations of an oil spill remover (detergent) : studies with the larvae of Sabellaria spinulosa. J. Mar. Biol. Association UK 48, 177-182.